

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Inmunología



TESIS DOCTORAL

**Activación de complemento por membranas citoplasmáticas
de linfocitos humanos, subpoblaciones celulares
responsables de la misma, posibles implicaciones biológicas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Jesús Martín Díaz

Madrid, 2015

70
213
198

María Jesús Martín Díaz



x - 53 - 044 237 - 9

ACTIVACION DE COMPLEMENTO POR MEMBRANAS CITOPLASMATICAS
DE LINFOCITOS HUMANOS. SUBPOBLACIONES CELULARES RESPONSABLES
DE LA MISMA. POSIBLES IMPLICACIONES BIOLOGICAS

Departamento de Inmunología
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Complutense de Madrid
1983



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº

198/83

© María Jesús Martín Díaz
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1983
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-28025-1983

MARIA JESUS MARTIN DIAZ

ACTIVACION DE COMPLEMENTO POR MEMBRANAS CITOPLASMATICAS
DE LINFOCITOS HUMANOS. SUBPOBLACIONES CELULARES RESPON_
SABLES DE LA MISMA. POSIBLES IMPLICACIONES BIOLOGICAS.

CARMEN GUTIERREZ MARTIN

Doctor en Medicina y Cirugia. Médico Adjunto del
Servicio de Inmunología de la Clínica Puerta de
_Hierro. Madrid.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Bioquímica

Año 1982

Agradezco la revisión y
presentación de este tra-
bajo al Profesor D. Angel
Martín Municio.

A mis padres.

El presente trabajo ha sido realizado en el Servicio de Inmunología de la Clínica Puerta de Hierro, bajo la dirección de la Dra. Carmen Gutierrez Martín, a quien agradezco su interés y colaboración.

Los experimentos con el FACS se han realizado en el Instituto de Inmunología de Basilea. La electroforesis celular se ha realizado en la " Bone and Joint Research Unit. London Hospital". Londres.

Mi total agradecimiento :

A C. Gutiérrez, J. M. Kreisler,
M. Gil, L. Merino, J. Vega, M. L.
Gaspar, J. Mulero, J. J. Rodriguez,
J. Hamel, R. Montero y a todo el
Servicio de Inmunología, pasado y
presente.

Y una especial gratitud a C. Martínez
Alonso y R. R. Bernabé por facilitar-
me la estancia en Basilea.

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL PRESENTE TRABAJO:

Ig : Inmunoglobulina

H-2: Sistema principal de histocompatibilidad en ratones

TRF : Factor que reemplaza a las células T

FCS : Suero bovino fetal

ConA : Concanavalina A

MLC : Cultivo mixto de linfocitos

MHC : Sistema mayor de histocompatibilidad

HLA : Sistema mayor de histocompatibilidad en humanos

CML : Linfocitotoxicidad mediada por células

CTL : Linfocitos T citotóxicos

NK : Citotoxicidad natural

DTH : Hipersensibilidad de tipo retardado

C3NeF : Factor nefrítico C3

C3bBb : C3 convertasa

Co F : Factor del veneno de cobra

MAC : Complejo de ataque a la membrana. C5b-9

SHN : Suero humano normal

PHA : Fitohemaglutinina

PBL : Linfocitos de sangre periférica

ADCC : Citotoxicidad dependiente de anticuerpos

EA : Hematíes sensibilizados con IgG

EAC : Hematíes sensibilizados con IgM y complemento

PBS : Tampón fosfato salino

E : Hematíes de carnero

IL-2 : Interleuquina 2

CTC : Células T en cultivo prolongado
M. E. : Movilidad electroforética
CAC : Células activadoras de complemento

INDICE

INTRODUCCIÓN

I.1. CONCEPTOS FUNDAMENTALES DEL SISTEMA INMUNE	1
I.2. LINFOCITOS B.....	4
I.2.1. Marcadores de superficie del linfocito B.....	4
I.2.1.1. Inmunoglobulinas de superficie.....	4
I.2.1.2. Receptores para complemento.....	4
I.2.1.3. Receptores para el fragmento Fc de la IgG..	4
I.2.2. Estructura de las inmunoglobulinas.....	5
I.2.3. Heterogeneidad funcional de los linfocitos B.....	7
I.3. LINFOCITOS T	11
I.3.1. Características y marcadores.....	11
I.3.2. Subpoblaciones funcionales de los linfocitos T... 13	
I.3.2.1. Linfocitos T reguladores.....	13
I.3.2.2. Linfocitos T efectores.....	15
I.4. MACROFAGOS	18
I.5. LINFOCITOS NULOS	19
I.6. SISTEMA DEL COMPLEMENTO.ACTIVACIÓN :VIAS CLÁSICA Y ALTERNATIVA.....	20
I.6.1. Vía clásica del sistema del complemento.....	22
I.6.2. Vía alternativa del sistema del complemento.....	26
I.7. MECANISMO DE ACTIVACIÓN DEL COMPLEMENTO POR LA VÍA ALTERNATIVA. DIFERENTES COMPONENTES IMPLICADOS.....	32
I.7.1. C3 : Cadenas, fragmentos y sitios funcionales....	32
I.7.2. Componentes de membrana que participan en la unión de C3b.....	34

1.7.3. Restricción del control del factor H sobre la C3 convertasa unida a las partículas activadoras.....	37
1.7.4. Naturaleza química de la unión entre el C3b y la partícula activadora.....-.....	39
I.8. FUNCIONES CLÁSICAS ASIGNADAS AL SISTEMA DEL COMPLEMENTO	43
1.8.1. Fagocitosis	43
1.8.2. Daño tisular.....	44
1.8.3. Control del tráfico de células y complejos inmunes.	44
1.8.4. Citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC)....	45
1.8.5. Inducción de la respuesta inmune.....	45
I.9. COMPLEMENTO Y HLA.....	47
I.10 ACTIVACIÓN DE COMPLEMENTO POR CÉLULAS Y MICROORGANISMOS	50
1.10.1. Vía clásica.....	50
1.10.2. Vía alternativa.....	51
I.11. ACTIVACIÓN DE COMPLEMENTO POR CÉLULAS A TRAVÉS DE LA VIA ALTERNATIVA. POSIBLES PAPELES BIOLÓGICOS DE ESTA ACTIVACIÓN.....	51

MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. MATERIAL PARA CULTIVOS CELULARES.....	58
II.2. REACTIVOS	58
II.3. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.....	60
II.4. PREPARACIÓN DE CÉLULAS LINFOIDES.....	60
II.5. ELIMINACIÓN PARCIAL DE CÉLULAS ADHERENTES.....	60
11.5.1. Tratamiento con polvo de hierro.....	62
II.6. MARCADORES DE SUPERFICIE DE LAS DISTINTAS POBLACIONES LINFOCITARIAS.....	62

- III -

II.6.1. Detección de células con receptores para el hematíe de carnero.....	62
II.6.2.* Detección de células con inmunoglobulinas de superficie.....	63
II.6.3. Detección de células con receptores para el fragmento Fc de la IgG.....	64
II.6.4. Detección de células con receptores de comple- mento.....	64
II.6.5. Detección de monocitos y macrófagos por la tinción de esterasas inespecíficas.....	65
II.7. SEPARACIÓN DE LINFOCITOS EN DIFERENTES POBLACIONES....	66
II.7.1. Obtención de linfocitos T por columnas de nylon..	66
II.7.2. Obtención de linfocitos T y no T por roseteo con hematíes de carnero.....	66
II.7.3. Obtención de linfocitos B, a partir de la pobla- ción no T, por eliminación de las células nulas..	67
II.7.4. Fraccionamiento de linfoblastos, obtenidos en un cultivo mixto de linfocitos, en función de su densidad por un gradiente discontinuo de Percoll.....	68
II.8. OBTENCIÓN DE IL-2.....	69
II.9. CULTIVO DE LINFOCITOS.....	70
II.9.1. En presencia de mitógenos.....	70
II.9.1.1. PHA.....	70
II.9.1.1. PWM.....	71
II.9.2. Cultivo mixto unidireccional de linfocitos.....	72
II.9.3. Cultivo prolongado de linfoblastos en presencia de IL-2	73

II.10 DETECCIÓN DE INMUNOGLOBULINAS EN SOBRENADANTES DE CULTIVOS POR LA TÉCNICA ELISA.....	74
II.11. ACTIVACIÓN DE COMPLEMENTO POR CÉLULAS.....	75
II.11.1. Incubación de las células con diferentes fuentes de complemento.....	75
II.11.2. Tinción con un suero fluoresceinado de cabra anti-C3 humano.....	76
II.11.3. Electroforesis bidimensional cruzada.....	77
II.11.4. Medida de la actividad hemolítica.....	79
II.12. TRATAMIENTO CON NEURAMINIDASA.....	80
II.13. ELECTROFORESIS CELULAR.....	80
II.13.1. Electroforesis celular analítica.....	80
II.13.2. Electroforesis celular preparativa.....	82
II.14. SEPARACIÓN DE POBLACIONES CELULARES CON EL FACS.....	82

RESULTADOS

III.1. ACTIVACIÓN DE COMPLEMENTO POR LINFOCITOS. CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACION LINFOCITARIA QUE ACTIVA COMPLEMENTO.....	85
III.1.1. Activación de complemento por linfocitos de sangre periférica.....	85
III.1.2. Viabilidad de las células después de la incubación con SHN.....	86
III.1.3. Papel de los anticuerpos en la activación de complemento.....	89
III.1.4. Vía por la que se produce la activación de complemento por linfocitos.....	89

III.1.5. Activación de complemento por linfocitos de diferentes órganos linfoides.....	92
III.1.6. Activación de complemento por subpoblaciones de linfocitos de sangre periférica.-	94
III.1.7. Activación de complemento por diferentes subpoblaciones de linfocitos de amígdalas.....	95
III.2. ESTUDIO FUNCIONAL DE LINFOCITOS B ACTIVADORES Y NO ACTIVADORES DE COMPLEMENTO.....	98
III.2.1. Estudios de fluorescencia y tamaño con el FACS en linfocitos B de amígdalas.....	98
III.2.2. Síntesis de DNA y secreción de inmunoglobulinas, en respuesta a PWM, de linfocitos B activadores y no activadores del sistema del complemento, en presencia de células T autólogas.....	99
III.3. ACTIVACIÓN DE COMPLEMENTO POR LINFOBLASTOS T.....	102
III.3.1. Activación de complemento por linfoblastos obtenidos por estimulación de linfocitos de sangre periférica con PHA. Cinética.....	106
III.3.2. Activación de complemento por linfoblastos obtenidos por estimulación de mitogénica de linfocitos T de sangre periférica.....	110
III.3.3. Activación de complemento por linfoblastos obtenidos por estimulación alogénica.....	112
III.3.4. Marcadores de superficie y activación de complemento en las diferentes fracciones de un gradiente discontinuo de Percoll de	

VI

las células de un cultivo mixto.....	114
III.3.5. Activación de complemento por linfoblastos	
T de un cultivo mixto.....	117
III.3.6. El crecimiento de los linfoblastos activa-	
dores de complemento es dependiente de IL-2...	118
III.3.7. Separación de linfoblastos activadores y no	
activadores de complemento.....	121
III.3.7.1. Estudio de fluorescencia y tamaño	
con el FACS de linfoblastos obtenidos	
por estimulación con PHA de linfoci-	
tos totales de sangre periférica.....	121
III.3.7.2. Síntesis de DNA de linfoblastos acti	
vadores y no activadores del sistema	
del complemento en respuesta a IL-2...	123
III.4. COMPONENTES DE MEMBRANA QUE PUEDEN INFLUIR EN LA	
ACTIVACIÓN DE COMPLEMENTO.....	130
III.4.1. Papel del ácido siálico en la activación	
del complemento.....	130
III.4.1.1. Efecto del tratamiento con neurami-	
nidasa sobre la activación de comple	
mento por linfocitos de amígdalas.....	130
III.4.1.2. Efecto del tratamiento con neuramini	
dasa sobre la activación de complemen	
to por linfoblastos.....	132
III.4.2. Efecto de la carga eléctrica sobre la activa	
ción de complemento.....	135
III.4.2.1. Movilidad electroforética y activa-	

ción de complemento por linfocitos de amígdalas.....	135
III.4.2.2..Movilidad electroforética y activa ción de complemento por linfoblastos de sangre periférica.....	139
<u>DISCUSION</u>	144
<u>CONCLUSIONES</u>	158
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	161

INTRODUCCION

I.1 CONCEPTOS FUNDAMENTALES DEL SISTEMA INMUNE

El reconocimiento específico y eliminación selectiva de las sustancias extrañas al organismo se realiza por un conjunto de moléculas y células, que constituyen el "Sistema Inmune". A estas sustancias capaces de provocar una respuesta inmune se las denomina "antígenos".

Cuándo un antígeno se introduce en un organismo la respuesta inmune que se produce es doble:

- humoral que se realiza a través de unas proteínas denominadas "inmunoglobulinas". La parte del antígeno a la cual se unen estas proteínas se denominan determinantes antigénicos o epítopes.
- celular que se realiza a través de células efectoras del propio sistema inmune.

El tipo de célula predominante en la respuesta inmune es el linfocito; siendo el linfocito B el responsable de la respuesta humoral y el linfocito T el responsable de la respuesta celular. Además de los linfocitos, el sistema inmune depende de otros tipos de células denominadas accesorias, entre las que cabe destacar a los monocitos-macrófagos, que facilitan o regulan la respuesta inmune (1-5).

Todas las células linfoides tienen su origen en la médula ósea, de donde emigran a unos órganos linfoides denominados primarios (Fig. 1), donde por influencia del microentorno proliferan y se diferencian adquiriendo los receptores de superficie necesarios para responder a un estímulo específico (6-8).

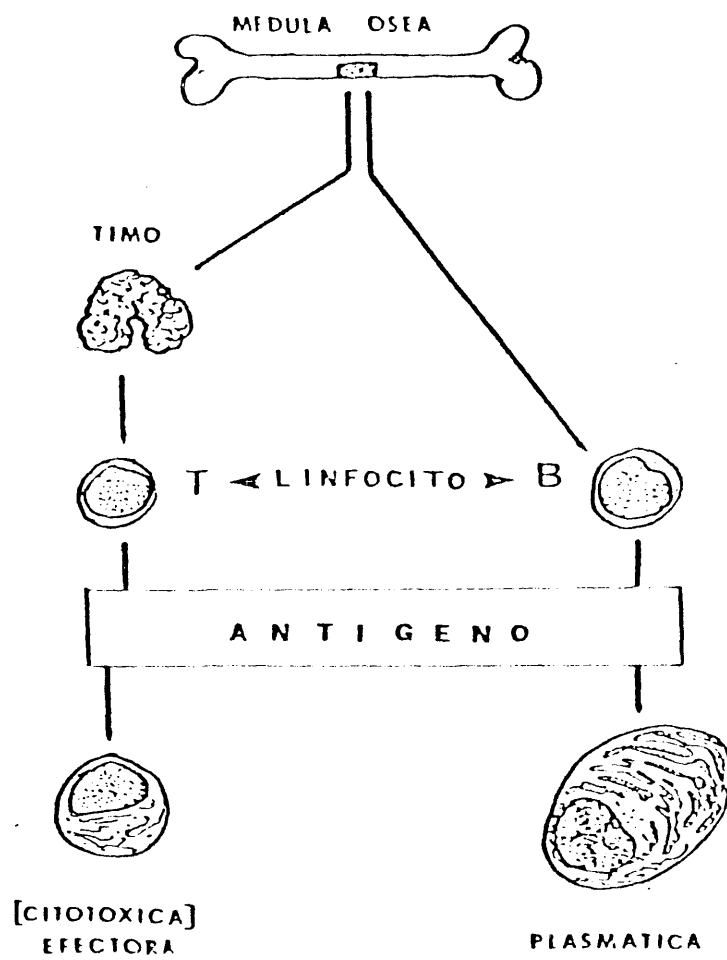


Figura 1

En el caso de los linfocitos T este órgano primario es el timo y en el de los linfocitos B es la médula ósea (bolsa de Fabricio en aves). Estos linfocitos son inmunocompetentes y se denominan linfocitos "vírgenes", que pueden ser estimulados por un antígeno para generar células efectoras y células de memoria. En la actualidad, existe una considerable evidencia acerca de que estos dos últimos tipos de células no derivan directamente de los linfocitos vírgenes, sino de una clase intermedia de células inmunocompetentes que provisionalmente se denominan linfocitos "maduros". No está claro aún si el paso de linfocitos "vírgenes" a "maduros" depende de la presencia de antígeno; pero la diferenciación de linfocitos "maduros" a células efectoras requiere estímulo por un antígeno específico. Esta activación, dependiente de antígeno, tiene lugar en unos órganos linfoides denominados secundarios (9) que poseen las estructuras y células accesorias necesarias para el correcto procesamiento y presentación antigénica. Estos órganos son principalmente el bazo y el sistema de ganglios linfáticos. La distribución de los linfocitos desde los órganos primarios a los secundarios se realiza a través de la sangre y del sistema linfático.

Después del encuentro con el antígeno, los linfocitos B se transforman en células plasmáticas, capaces de segregar inmunoglobulinas, y los linfocitos T se transforman en células efectoras que controlan la respuesta celular (rechazo alogénico, reacciones de injerto contra huésped, hipersensibilidad de tipo retardado, destrucción de células infectadas por virus, etc.) y colaboran con los linfocitos B en la respuesta a ciertos antígenos denominados timo-dependientes.

I.2. LINFOCITOS B

I.2.1. Marcadores de superficie del linfocito B

I.2.1.1. Inmunoglobulinas de superficie

Su existencia fué propuesta hace 73 años por Ehrlich (10) y hoy en día constituye el marcador más característico de la estirpe celular B (11,12,13). Es generalmente aceptado que las inmunoglobulinas de superficie actúan como receptor específico del antígeno.

I.2.1.2. Receptores para complemento

Uhr y col. (14) describieron que complejos antígeno - anticuerpo - complemento son capaces de unirse a algunos linfocitos de cobaya, a través de receptores de membrana para diversos componentes de complemento. Posteriormente, en humanos se ha descrito la presencia de receptores para C1q (15), C3d (16, 17), C4b (18) y C3b (19). Parece ser que en ratón existen células B sin receptores para complemento; mientras que en humanos la mayoría de los linfocitos B tienen receptores para complemento (20). También se ha demostrado la existencia de receptores de complemento en macrófagos y PMN (20).

I.2.1.3. Receptores para el fragmento Fc de la IgG.

La presencia del receptor para el Fc de la IgG en las células con inmunoglobulinas de superficie, ha sido motivo de discre

pancia entre distintos grupos de investigadores. Así, para unos ninguna célula B expresaría este tipo de receptor (21) mientras que para otros autores, este sería un marcador propio de un gran número de linfocitos B (22). Hoy en día se tiende a pensar que los linfocitos B presentan este receptor, pero a diferencia de otras poblaciones, Fc positivas, precisarían una alta concentración de IgG sobre la superficie del hematíe para formar las rosetas (23).

I.2.2. Estructura de las inmunoglobulinas:

Las inmunoglobulinas son glicoproteínas constituidas por 4 cadenas polipeptídicas, dos de las cuales tienen un peso molecular de 53.000 y se denominan cadenas "pesadas" (H) y las otras dos tienen un peso molecular de 20.000 y se denominan "ligeras" (L), que permanecen unidas por puentes disulfuro e interacciones no covalentes (24). En vertebrados superiores existen 5 isotipos diferentes de cadenas pesadas denominadas: $\delta, \gamma, \alpha, \epsilon$ y μ y dos tipos de cadenas ligeras "Kappa" y "lambda" las cuales al combinarse entre sí constituyen las diferentes inmunoglobulinas IgA, IgG, IgM, IgD é IgE. En una molécula de inmunoglobulinas las dos cadenas ligeras son siempre iguales (25,26).

Por estudios de secuenciación de aminoácidos se comprobó que la región C terminal era muy similar en las diferentes cadenas polipeptídicas, mientras que la región N terminal presentan una gran variabilidad de un polipéptido a otro. Estos dos segmentos de la molécula se designaron región constante y región variable respectivamente (27). El número de aminoácidos de las

regiones variables es muy similar en las cadenas ligeras y pesadas.

Se comprobó que en las regiones variables residía el centro activo (paratope) de unión con el antígeno (epitope), mientras que en las regiones constantes residen las funciones efectoras que son comunes a todas las inmunoglobulinas de una clase dada (28). Cada molécula de inmunoglobulina posee dos sitios idénticos de unión con el antígeno.

Por análisis genéticos de las inmunoglobulinas se ha podido observar la existencia de 3 tipos de marcadores antigénicos:

- Alotipos son variantes de las inmunoglobulinas sobre las regiones constantes, responsables de la inmunización homóloga (entre individuos de la misma especie).

- Isotipos son determinantes antigénicos que caracterizan cada clase y subclase de las cadenas ligeras y pesadas y que son responsables de la inmunización heteróloga (entre especies).

- Idiotipos son determinantes antigénicos que se encuentran sobre las regiones variables y que confieren individualidad a las inmunoglobulinas (28, 29 y 30).

Por último, existen dos teorías para explicar la diversidad de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas:

- la teoría de la línea germinal postula que en el genoma del individuo existen la mayoría de los genes que codifican todas las regiones variables, (V) es decir, las especificidades frente a todos los antígenos posibles.

7

- la teoría de la mutación somática postula que existe un número de genes (V) menor, que se diversificaría por mutaciones ó re combinaciones durante el desarrollo del sistema inmune (31, 32).

1.2.3. Heterogeneidad funcional de los linfocitos B

Los linfocitos B constituyen una población heterogenea tanto en su perfil funcional como en la expresión de sus marcadores de superficie.

Se ha trabajado intensamente sobre la caracterización de los estadios del desarrollo de los linfocitos B analizando la adquisición ontológica de varios isotipos de inmunoglobulinas, de antígenos Ia, de receptores para la porción Fc de la IgG y de receptores para complemento. Se ha encontrado que la secuencia de aparición de estos marcadores es independiente de las células T é inalterable por un antígeno externo. Las cadenas pesadas μ , que es el único isotipo detectado en el citoplasma de las células pre-B en hígado fetal, preceden a todos los isotipos que se expresan en la membrana de células B.

También se ha estudiado la respuesta a diferentes tipos de mitógenos y de antígenos en linfocitos B, y la inactivación selectiva después de la exposición a señales de tolerancia. No obstante, no se ha llegado a establecer la causa de la heterogeneidad funcional de la población B, sobre la cual existen dos teorías diferentes:

- selectiva supone que existen subpoblaciones de células B que divergen de un "sistema celular" común (33,34, 35).

- reguladora supone que la heterogeneidad de linfocitos B es el resultado de una expresión asimétrica de estadios secuenciales de maduración de una línea simple B (36, 37), es decir, esta línea simple de células B produce diferentes tipos de inmunoglobulinas en respuesta a activadores cualitativamente distintos.

Diferentes autores partidarios de la teoría selectiva han descrito la existencia en ratones de dos subpoblaciones definidas por los antígenos : Lyb 3,5,7 (38) y Ia W39 (39), presentes en una de ellas y ausente en la otra. Estas subpoblaciones se diferencian en los mitógenos y antígenos a los que son capaces de responder (40) y en los isotipos de Igs que producen en la respuesta; así como en la existencia o no de restricción a nivel de MHC. (41).

Otros autores (42) definen también dos subpoblaciones de linfocitos B que difieren en su requerimiento para la activación: una necesita contacto celular con las células T "ayudadoras" con restricción genética a nivel H2; y otra responde al TRF secretado por células T "ayudadoras" y sin existir tipo alguno de control genético.

En humanos, estudios hechos con diferentes mitógenos (43,44) conducen a resultados análogos a los obtenidos con ratones (37), que llevan a concluir que los diferentes mitógenos estimulan distintas subpoblaciones o estadios de diferenciación de los linfocitos B.

También se han utilizado los isotipos de las inmunoglobulinas expresadas en la membrana citoplasmática para separar las poblaciones linfocitarias B, y estudiar sus capacidades funcionales:

-Ault y Towle (45) separan los linfocitos B en función de la expresión de IgG sobre su membrana y encuentran que la mayoría de las células que expresan IgG, son positivas en la expresión de IgM e IgD, y responden fuertemente a PWM, produciendo los isotipos μ y γ ; mientras que las células que no expresan IgG en su membrana no son capaces de sintetizar inmunoglobulinas de las clases G y M. No obstante las dos subpoblaciones son capaces de proliferar en respuesta a este mitógeno, siendo mayor la proliferación en el caso de las que presentan IgG en su membrana.

-Saiki y Ralph (46) sugieren que las células mononucleadas de sangre periférica que maduran para producir IgG ó IgA, en respuesta a PWM y Staphylococcus aureus, son células negativas en la expresión de IgM ó IgD en su membrana. Analogamente Levitt y Dagg (47) demuestran que la mayoría de los precursores de IgG ó IgA en respuesta a PWM son negativas para IgM en la membrana, de acuerdo con los datos de Thiele al al. (48).

Así mismo, se ha estudiado la inhibición de la producción de inmunoglobulinas por tratamiento de los linfocitos B precursores de las células plasmáticas con sueros anti-inmunoglobulinas, obteniendo resultados que son contradictorios a los anteriores, ya que según aquellos los precursores de células productoras de

IgG tendrían IaM e IaD en su membrana (49,50).

Todos estos trabajos buscan la correlación entre la expresión de los isotipos de las inmunoglobulinas de membrana y el estadio de maduración ó subpoblación de los linfocitos B, teniendo en cuenta la secuencia en que se encuentren los genes que codifican las regiones constantes de las cadenas pesadas en el DNA.

Otros autores han utilizado otros marcadores diferentes de las inmunoglobulinas para separar los linfocitos B y hacer un estudio funcional:

- Lucivero et al. (51) los separan en virtud de la capacidad para formar rosetas espontáneas con eritrocitos de ratón y encuentran que linfocitos que tienen esta propiedad expresan en su membrana IaM e IaD, pequeñas cantidades de IgG e IgA y receptores para complemento, pero no para el fragmento Fc de la IgG; y responden probablemente a PWM; mientras que los linfocitos B que no son capaces de formar aquellas rosetas son ricos en receptores Fc. En base a estas observaciones y a las encontradas en leucemias linfoides crónicas, donde existe un 65-80% de células B con este marcador (52), ellos indican que puede existir una correlación entre la presencia de receptores para eritrocitos de ratón y un paso en la maduración de las células B, que a su vez puede estar relacionado con la presencia de receptores para el fragmento Fc de la IgG.

Esta pequeña revisión sobre linfocitos B humanos nos muestra lo controvertida que está la cuestión de las subpoblaciones de

linfocitos B, controversia generada principalmente por la escasa información que existe sobre el tema.

La única conclusión posible es que existen diferentes, quizás preexistentes, subpoblaciones de células B (teoría selectiva) ó diferentes estadios secuenciales de maduración provenientes de una sola línea B (teoría reguladora), que tienen distinto fenotipo y que pueden ser estimulados a células productoras de distintos isotipos de inmunoglobulinas por activadores de estas células B, los cuales tienen la habilidad de discriminar entre aquellos estadios ó subpoblaciones.

I.3. LINFOCITOS T

I.3.1. Características y marcadores

Los linfocitos T constituyen una población heterogénea de células inmunocompetentes responsable de una gran variedad de funciones inmunológicas.

Los linfocitos T poseen una serie de estructuras antigénicas que los definen fenotípicamente. En el ratón estas estructuras son : el antígeno θ ó Thy1, que puede presentarse en dos formas alélicas Thy 1.1 y Thy 1.2., la serie de aloantígenos Ly: (Ly 1.2.3 y 1.5) y el aloantígeno TL. La expresión de estos antígenos varía con los estadios de diferenciación (53,54,55,56).

En humanos, gracias al uso de anticuerpos monoclonales, se han podido definir antígenos presentes en los diferentes estadios de diferenciación: así, aproximadamente un 10% de los lin-

focitos tímicos son capaces de reaccionar con dos anticuerpos monoclonales anti-T9 y anti-T10. (estadio I). Con la maduración, los timocitos pierden T9, retienen T10 y adquieren T6. Simultáneamente, estas células expresan T4 y T5/T8 (estadio II). Estos tres antígenos están presentes en un 70% de la población tímica. A medida que avanza la maduración expresan T1 y T3 y se dividen según T4 y T5 en dos subpoblaciones (estadio III). Las células adquieren la competencia inmunológica en este estadio. Una vez fuera del timo pierden T10 y las dos subpoblaciones (T1, T3, T4) y (T1, T3, T5) representan las funciones cooperadora (51, 58) y supresora/citotóxica respectivamente (59, 61, 61).

El antígeno T4 aparece en un 55-65% células T periféricas y el T5 está presente en 20-30% (58).

A pesar de todo, el único marcador universalmente reconocido de linfocitos T humanos es la capacidad que tienen dichos linfocitos de formar rosetas con hematíes de carnero (E). Este marcador, aunque presente en todas las poblaciones linfocitarias derivadas del timo, no parece que se encuentre con igual intensidad en toda la gama de linfocitos T. Así, podemos encontrar linfocitos con alta afinidad por el hematíe de carnero, que son capaces de formar rosetas incluso en malas condiciones de ensayo (29°C y baja concentración de suero bovino fetal (FCS)) ó aquellos que necesitan condiciones muy estrictas como baja temperatura (4°C), alta relación hematíe/linfocito y alta concentración de FCS, estos serían linfocitos con baja afinidad para el E. (62). En los linfocitos T se han estudiado diferentes marcadores de superficie presentes en distintas subpoblaciones, ya que se considera

que estos marcadores puedan estar implicados en actividades funcionales e interacciones celulares. También se han definido diferentes subpoblaciones de células T humanas en base a distintas estructuras de membrana, como receptores para varias lectinas (63), receptores para histamina (64) y la expresión de Ia (65, 66). La mayoría de estos marcadores no parecen estar directamente relacionados con las funciones de las células T. Una excepción importante es el receptor para la porción Fc de las inmunoglobulinas IgG e IgM (67,68). Estos receptores no están presentes en los timocitos; pero si en diferentes subpoblaciones de linfocitos T periféricos (69,70,71). También los receptores para el fragmento Fc de la IgG se encuentran en una fracción de células T activadas, principalmente después de la estimulación alogénica (72,73).

I.3.2. Subpoblaciones funcionales de los linfocitos T.

Los linfocitos T pueden clasificarse, bajo un aspecto funcional, en dos categorías: células reguladoras y células efectoras.

I.3.2.1. Linfocitos T. reguladores

Bajo esta denominación se engloban a aquellos linfocitos T que influyen en la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas y a aquellos que regulan la respuesta de las células T efectoras.

La regulación de la respuesta inmune puede ser positiva, en cuyo caso nos encontraremos frente a linfocitos T "ayudadores" o

negativa, que se lleva a cabo por linfocitos T "supresores" (13).

- Linfocitos T ayudadores (TA). Este término surgió por la participación del linfocito T en la respuesta humoral a determinados antígenos (los timodependientes). Estaríamos ante la cooperación de linfocitos TA y B en la respuesta inmune. Posteriormente, se observó que estos linfocitos (TA) cooperaban en la generación de células T efectoras. Sería una cooperación entre TA y T efectoras (74, 77).

En ratón, esta subpoblación celular viene definida fenotípicamente por los antígenos Thy 1, Ly 1⁺, Ly 2,3- y comprende alrededor de un 30% de los linfocitos T periféricos. En humanos, la mayoría de los autores (70, 78) consideran que los linfocitos T ayudadores son aquellos que tienen receptor para la porción Fc de la IgM y que reaccionan con el anticuerpo monoclonal OKT4. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los linfocitos con receptor para el fragmento Fc de la IgM contienen células del tipo supresor, si se estimulan con ConA (78).

- Linfocitos T supresores (TS): son aquellos que en determinadas circunstancias son capaces de suprimir la respuesta inmune. La supresión se observó en la producción de inmunoglobulinas tanto en ratones, como en humanos, lo que implica interacciones entre linfocitos TS y B; aunque posteriormente se describió la interacción entre TS y T efectoras que regulan negativamente la respuesta de éstos últimos (79, 80). Fenotípicamente, en ratones estos linfocitos se definen por la presencia de Thy 1, Ly 1⁻, 2,3⁺, (a veces Ly 1⁺). Sobre esta pobla-

ción se han descrito antígenos codificados por el locus I-J de la región I del H-2 (81, 82).

En humanos, la población supresora puede tener receptores para el fragmento Fc de la IgG y de la IgM, aunque parece que los que tienen receptores para la porción Fc de la IgM necesitan la estimulación con ConA para producir supresión (78). Así mismo, esta población reacciona con el antisuero monoclonal OKT-8.

Estudios de clonaje han corroborado los datos fenotípicos de los linfocitos T reguladores de ratón, pero no han confirmado los datos sobre los antígenos T4 y T8 en las poblaciones ayudadoras y supresoras en el caso de humanos.

1.3.2.2. Linfocitos T efectores

Estos linfocitos llevan a cabo funciones tales como: la respuesta proliferativa a aloantígenos, respuesta citotóxica y respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado.

- Respuesta proliferativa a aloantígenos.

Se puede estudiar "in vitro" en la prueba denominada cultivo mixto de linfocitos (MLC), que se relaciona "in vivo" con la fase de reconocimiento y rechazo de las reacciones de transplante e injertos (83). El cultivo mixto de linfocitos fue originalmente descrito por Bach y col. (84), y Bain y col. (85) y consiste en el cultivo "in vitro" de linfocitos de dos individuos antigénicamente diferentes. Como consecuencia del reconoci-

to antigénico las células comienzan a expandirse y la medida de este crecimiento es lo que constituye el MLC. Los antígenos que reconocen las células son, principalmente, los denominados LD (Lymphocyte determinant) que están codificados en el HLA ó H-2 del sistema mayor de histocompatibilidad (MHC) (86). Este tipo de respuesta se lleva a cabo por linfocitos T, con un fenotipo idéntico en ratón a las células ayudadoras Ly 1 ⁺, 2.3⁻, de tal manera que serían células que ayudarían al desarrollo de las células citotóxicas Ly 1 ⁻, 2, 3 ⁺ que se producen en un cultivo mixto de linfocitos.

- Respuesta citotóxica:

La respuesta citotóxica mediada por las células T puede ser de varios tipos:

a) - Linfocitotoxicidad mediada por las células (CML).

Las células T capaces de mediar esta reacción se generan en el cultivo mixto de linfocitos. Para ejercer su función citotóxica primeramente se produce un reconocimiento y unión con la célula diana (87), donde parece residir la especificidad del ataque de la célula efectora. Posteriormente, se produce la destrucción de la célula diana por un mecanismo inespecífico y todavía desconocido.

Los linfocitos T citotóxicos son específicos, es decir, matan específicamente a las células diana contra las cuales hayan sido sensibilizados (88). Las células efectoras en este tipo de citotoxicidad son de la estirpe T, aunque fenotípicamente diferentes a las responsables del cultivo mixto de linfocitos. En

ratón, estas células T citotóxicas son Lyt 1 ⁻, Lyt 2,3 ⁺, Ia ⁻; mientras que en humanos se asocian con aquellas poblaciones con receptores para el fragmento Fc de la IgG, ó aquellas que expresan los antígenos T1, T3 y T5/T8, aunque esto debe confirmarse en estudios posteriores (89,57).

Por último, hay que mencionar un fenómeno relacionado con estas células citotóxicas (CTL), conocido como "restricción H-2" y que fué descubierto por Zinkernagel y Doherty (90). Este fenómeno consiste en que cuando activamos CTL en un MLC frente a células haptenizadas ó pretratadas con virus, estas CTL solo son activas cuando la célula efectora y la célula diana son iguales en las regiones K, D del H-2 (la célula diana debe presentar siempre el hepteno ó el virus contra el cual se haya sensibilizado). Este fenómeno ha planteado la necesidad de un doble reconocimiento antigénico del linfocito T efector para llevar a cabo su función citotóxica, uno a través del MHC y otro que reconocería al antígeno (hapteno, virus, etc.) asegurando así la restricción singénica en la estimulación de células T (91, 92, 93).

b) - Citotoxicidad natural (NK) ó espontánea.

Se puede definir como aquella actividad citotóxica que presentan linfocitos de individuos sanos, no sensibilizados, cuando se enfrentan a ciertas células diana en un sistema "in vitro" (94,95).

Existe controversia sobre el tipo de célula que media esta actividad citotóxica, aunque muchos trabajos correlacionan a las

células efectoras de esta citotoxicidad con células T. En sistemas murinos, Heberman et al. (96) demostraron que usando altas concentraciones de antisueros anti-Thy 1, en presencia de complemento, desaparecería la actividad NK. En humanos, algunos autores piensan que todas las células NK tienen receptores para hematíes de carnero, aunque de baja afinidad (97).

- Hipersensibilidad de tipo retardada (DTH).

Es una forma de la respuesta inmune mediada por células T. Si a un individuo que esté sensibilizado a un agente infeccioso, se le inyecta una pequeña cantidad de antígeno en la piel, las células de la memoria sensibilizadas se acumulan y atraen a otras células al lugar donde el antígeno ha sido inyectado, originando la aparición de una pápula visible a las 48 horas (de ahí el término retardada). Esta respuesta se lleva a cabo por linfocitos T (DTH), capaces de segregar mediadores activos que causan una acumulación de células mononucleares y basófilos y un aumento de la permeabilidad vascular. (98, 99).

I.4. MACRÓFAGOS

El macrófago es el tercer tipo de célula que está íntimamente asociado al desarrollo y expresión de la respuesta inmune. A diferencia de los linfocitos T y B, los macrófagos no están ni restringidos clonalmente ni son antígenos específicos. Los macrófagos tienen varias características y marcadores de superficie que hace que su identificación sea relativamente fácil. La más clásica de sus propiedades es su capacidad fagocítica, con gran

facilidad para ingerir partículas marcadoras que pueden ser visualizadas al microscopio. Además contienen gran cantidad de vacuolas en las que existen enzimas lisosómicos, lo que permite el uso de métodos histoquímicos para su identificación. El más empleado de estos métodos es la tinción con esterasas, descrita originalmente por Yam et al. (100) y modificada posteriormente por Koski et al. (101).

Presentan también receptores para el fragmento Fc de la IgG y para diferentes componentes del complemento: C3b, C4b y C3d (102,103).

Entre las funciones de los macrófagos están la captación, metabolismo y presentación antigénica a los linfocitos T y B, la regulación de la respuesta humoral y celular directamente o por la liberación de factores solubles (interleuquina 1), secreción de enzimas y factores del complemento, mecanismos de fagocitosis y pinocitosis así como su función activa en los procesos de la respuesta inflamatoria (104).

I. 5. LINFOCITOS NULOS (" NULL")

Se definen como linfocitos nulos aquellos que carecen de los receptores o capacidades funcionales típicas de los linfocitos T, B o macrófagos.

Estas células expresan receptores para el fragmento Fc de la IgG. Morfológicamente se parecen a los linfocitos T, de tal modo que se ha descrito una gran correlación entre las células nulas y los linfocitos T.

1. 6 SISTEMA DEL COMPLEMENTO. ACTIVACIÓN: VÍAS CLÁSICA Y ALTER-
NATIVA.

Los orígenes de nuestro conocimiento sobre el complemento aparecen unidos a la microbiología y se remontan a un siglo. En 1880, Buchner señaló que el suero fresco no era un buen medio de cultivo para bacterias, ya que se vuelve fácilmente putrescible después de permanecer 30 min. a 56°C, o por envejecimiento (pasando unos días a temperatura ambiente). Nueve años más tarde, se precisó que, "in vitro" y en ciertas condiciones, el suero es capaz de lisar las bacterias. A esta propiedad debida a un factor termolábil, Buchner la denominó "alexina", es decir "sustancia que defiende".

En 1895, Bordet estableció que la vibriolisis necesita la acción ó concurso de dos grupos factores, unos específicos, termoeestables: anticuerpos, y otros no específicos, termolábiles, presentes en el suero y cuyo conjunto forma el sistema del complemento.

El complemento es un sistema biológico, multimolecular que constituye el mediador humoral primario de las reacciones antígeno-anticuerpo. La activación del complemento puede tener dos consecuencias biológicas distintas:

1 - alteraciones funcionales y estructurales de las membranas biológicas y muerte celular.

2 - activación de algunas funciones celulares especializadas, que tienen lugar por los productos de reacción de la acti-

vación del complemento.

La significación biomédica del complemento ha sido establecida en los últimos años como su participación en la resistencia a infecciones y a ciertas enfermedades (105, 106).

Operacionalmente el sistema del complemento puede dividirse en dos vías, cada una de las cuales comprende varias unidades funcionales. Las 11 proteínas que comprenden la vía clásica han sido agrupadas en 3 unidades funcionales:

- unidad de reconocimiento.: Clq,Clr, Cls
- unidad de activación.: C2, C3, C4
- complejo de ataque a la membrana (MAC): C5, C6, C7, C8 y C9.

La vía alternativa o de la properdina está compuesta al menos por 5 proteínas del suero, una de las cuales C3, es también operativa en la vía clásica. La vía alternativa prescinde del C1, C2 y C4, activa desde C5 hasta C9 de una manera análoga a la vía clásica. En adición a estas 15 proteínas, el sistema del complemento incluye 3 reguladores: un inhibidor enzimático y 2 enzimas inactivadoras, es decir, el sistema completo está compuesto por 18 proteínas diferentes.

Una de las características, que constituye la base molecular de las actividades biológicas del complemento es su inherente habilidad para promover la transición de moléculas solubles a constituyentes periféricos o quizás integrales de la membrana. Esta habilidad es dependiente de la generación de regiones de unión sobre estas moléculas por los enzimas que se

generan en la activación del complemento. Las enzimas responsables tienen una estructura cuaternaria compleja, son endógenas al sistema y representan ejemplos de proteasas altamente especializadas. Su acción se produce como consecuencia del ensamblaje de complejos multimoleculares distintos a partir de componentes simples, que en estado nativo reaccionan reversiblemente. El daño celular dependiente de complemento se produce por un complejo de proteínas, que rompe la membrana presumiblemente por ataque físico-químico.

También existen productos no citolíticos que interaccionan con las membranas celulares y provocan diversos fenómenos biológicos. Entre estos productos, existen dos péptidos de bajo peso molecular. (C3a, C5a) que tienen un alto contenido de α -hélice, la cual puede ser un reflejo de su afinidad por los receptores de la membrana. A causa de sus funciones orientadas hacia la membrana, el complemento puede ser un efector extracelular y modulador de las membranas biológicas.

I.6.1. Vía clásica del sistema de complemento.

Los componentes de la vía clásica son 11 glicoproteínas (107). Las cadenas polipeptídicas de todas estas proteínas se designan con letras griegas, p.e.: C3 α y C3 β ; y los fragmentos que resultan como consecuencia de la acción enzimática se designan con letras latinas, p.e.: C3a y C3b. Las características físicas de todas estas proteínas las podemos observar en la tabla 1.

Los procesos bioquímicos que tienen lugar en la activación de complemento por la vía clásica las podemos resumir en:

- a) Transición de proteínas solubles a proteínas de membrana.

Todas las proteínas son solubles en soluciones acuosas. En estado nativo ninguno de los componentes tienen afinidad por la membrana. En la activación adquieren esta afinidad, que puede producirse por 3 mecanismos:

- interacción reversible iónica aplicable a C1.
- activación enzimática de sitios de unión, aplicable a C2, C3, C4 y C5.
- adsorción aplicable a C6, C7, C8 y C9.
- b) Ensamblaje de complejos enzimáticos: C3 y C5 convertasa.

C3 convertasa es un complejo formado por los fragmentos C2a y C4b; producidos por la acción de C1s activado. Este complejo enzimático actúa sobre C3 originando C3a y C3b.

C5 convertasa es un complejo multienzimático formado por C2a, C4b y C3b. Actúa sobre el componente C5 originando C5a y C5b.

- c) Activación de péptidos y anafilotoxinas.

Por la acción de las actividades enzimáticas anteriores se producen una serie de péptidos, de los cuales C3a y C5a tienen actividades biológicas similares como son producir la liberación de histamina de los mastocitos, la migración quimiotáctica de los polimorfos nucleares y la contracción de la musculatura lisa.

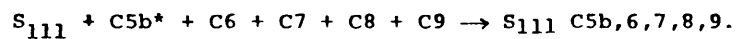
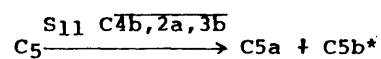
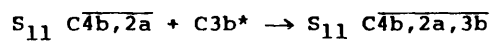
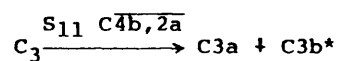
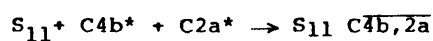
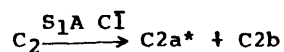
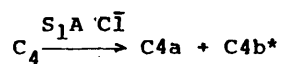
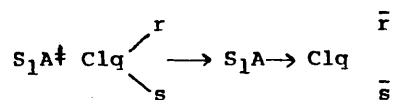
TABLA 1

CARACTERÍSTICAS DE LAS PROTEÍNAS DE LA VÍA CLÁSICA

Proteína	Concentración en el suero. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Coefficiente de Sedimentación. (s)	Peso Molecular	Movilidad Electroforética Relativa	Nº de Cadenas
Clq	180	11.1	400,000	γ_2	18
Clr	-	7.5	180,000	β	2
Cl _s	110	4.5	86,000	α	1
C2	25	4.5	117,000	β_1	-
C3	1600	9.5	180,000	β_2	2
C4	640	10.0	206,000	β_1	3
C5	80	8.7	180,000	β_1	2
C6	75	5.5	95,000	β_2	1
C7	55	6.0	110,000	β_2	1
C8	80	8.0	163,000	γ_1	3
C9	230	4.5	79,000	α	-

24

Teniendo en cuenta estos procesos, veamos las reacciones que tienen lugar en la activación de complemento por la vía clásica:



Se producen 3 unidades funcionales que tienen 3 sitios de unión a la membrana topológicamente distintos: (Fig. 2)

- sitio I ó sitio de reconocimiento
- sitio II ó sitio de activación
- sitio III ó sitio de lisis.

1.6.2 Via alternativa del sistema del complemento

En 1954, Pillemer et al. (108) encuentran un nuevo mecanismo de resistencia a las infecciones, gracias a una proteína presente en suero normal y denominada properdina, que es capaz de reaccionar de una forma no específica con una gran variedad de polisacaridos y lipopolisacaridos. Sin la participación de anticuerpos específicos, la properdina fué capaz de activar complemento y ser instrumento de la destrucción de bacterias, la neutralización de virus y la lisis de eritrocitos de pacientes con hemoglobinuria paroxística nocturna. La acción de la properdina requiere Mg^{2+} , una actividad sensible a hidrazina llamada factor A y una actividad termolábil llamada factor B (109). Después de varios años de discusión, se postuló un segundo mecanismo de activación de complemento (110).

En 1903, Flexner y Naguchi (111) demostraron la abolición de la actividad hemolítica del suero por veneno de cobra. Este era capaz de activar el sistema de complemento sin consumo de los componentes tempranos. Debido a que este sistema activador era operativo en contra de bacterias y en la lisis de eritrocitos con hemoglobinuria paroxística nocturna (112), se pensó en una relación entre este sistema activador y el sistema de la properdina y se identificó al factor A con C3 y al factor B con C3PA (C3 proactivador).

Las proteínas que forman parte de esta vía de activación y sus características se pueden observar en la tabla 2, a partir del componente C5, este sistema comprende los mismos elementos

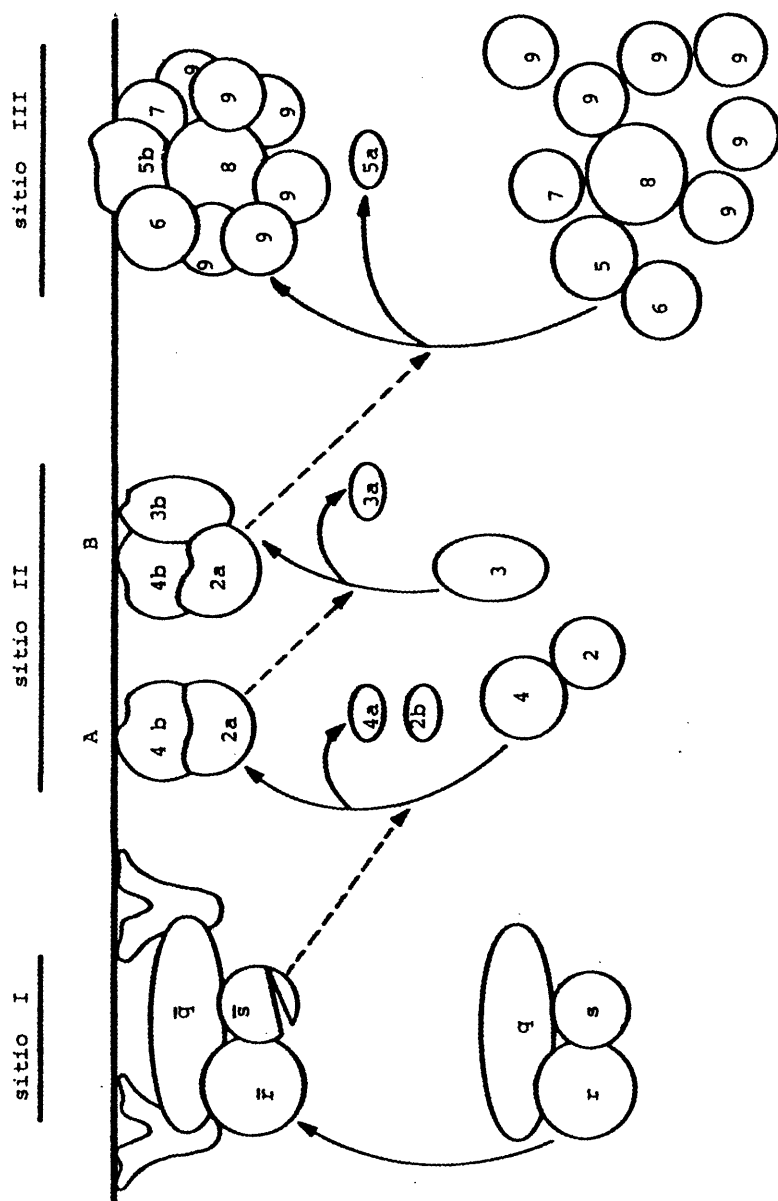


Figura 2. SITIOS DE UNION EN LA MEMBRANA, EN LA ACTIVACION DE COMPLEMENTO POR LA VIA CLASICA

finales que la vía clásica.

Un esquema de la activación de complemento por la vía alternativa que comprende iniciación, amplificación, estabilización y control se puede ver en la figura 3.

En pocas palabras lo podemos resumir: C3b unido a la membrana celular une reversiblemente el factor B (113), en presencia de Mg^{2+} , dando lugar a la aparición de un sitio en dicho factor, susceptible al ataque por una proteína con actividad serin-esterasa denominada factor D. El fragmento que se produce en este ataque se denomina Bb y permanece unido a C3b originando un complejo llamado C3 convertasa que produce la ruptura de C3, de una forma análoga a como ocurre en la vía clásica por la acción de C4a2b ó C3 convertasa. El centro activo para la ruptura de C3 reside en el fragmento Bb y aparece solamente cuando está unido al fragmento C3b.

El control intrínseco de esta convertasa que supone la liberación de Bbi, es superado por la propedina, proteína que se une a C3b y retarda la caída de Bb (114). El control negativo se lleva a cabo por una proteína denominada factor H ($\beta 1H$), que se identificó por su capacidad para facilitar la inactivación de C3b por el factor I (C3b inactivador) (115). Este factor no puede inactivar el C3b que se encuentra unido a Bb (116), por lo que es necesaria la unión del factor H al fragmento Bb para que en el fragmento C3b aparezca el sitio susceptible a la proteólisis por el factor I. La acción de este es totalmente necesaria, ya que sino el C3b podría originar una nueva C3 convertasa.

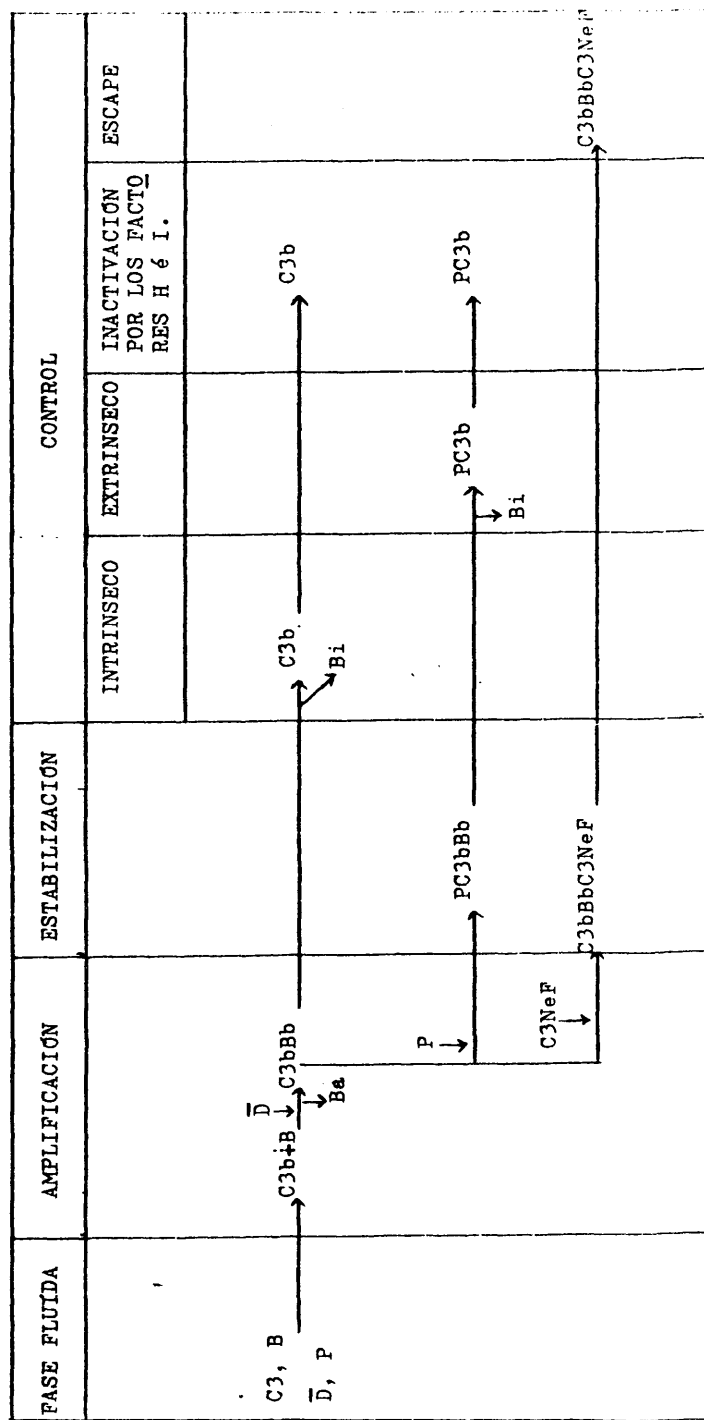
TABLA 2

CARACTERÍSTICAS DE LAS PROTEÍNAS DE LA VÍA ALTERNATIVA

Proteína	Concentración en el suero. ($\mu\text{g/ml}$)	Coefficiente de Sedimentación (s)	Peso Molecular	Movilidad Electroforética Relativa
Properdina	25	5.4	184,000	γ_2
C3	1600	9.5	180,000	β_2
C3b	--	9.0	171,000	α_2
Factor B	200	5-6	93,000	β
Factor D	--	3	24,000	α

FIGURA 3

ACTIVACIÓN DE COMPLEMENTO POR LA VIA ALTERNATIVA



La función estabilizadora de la properdina sobre la convertasa C3bBb es altamente reversible por la acción del factor H; mientras que la estabilización que produce el factor nefrítico C3 no lo es (C3NeF) (116). Este es un autoanticuerpo dirigido contra antígenos expresados en la C3 convertasa de amplificación (C3bBb) (117). La diferencia entre la properdina y el factor nefrítico C3 se encuentra en que la primera es una proteína fisiológica encargada de mantener la homeostasis y el último representa una proteína patológica que lleva el sistema fuera de control. La acción amplificadora de la properdina está contrarrestada por la acción concertada de los factores H e I, hecho que no ocurre en el caso del factor nefrítico.

El problema en el caso de esta vía de activación de complemento se encuentra en la iniciación, aunque está admitido que se forma una C3 convertasa soluble, a partir de la cual se origina el C3b que se unirá a las diferentes partículas o membranas. Müller - Eberhard (105) plantea la necesidad de un factor de iniciación para que se origine esta primer convertasa (que es estabilizada por la acción de la properdina), mientras que Austen (118) propone una acción continuada en fase fluida del factor D sobre el factor B para llegar a originar el complejo C3Bb que actúa sobre C3 nativo produciendo el C3b necesario para la formación de la C3 convertasa de amplificación.

Sea cual sea el mecanismo de iniciación, el C3b producido por esta C3 convertasa soluble se une a las superficies, las cuales deben ejercer una acción directa sobre la acción concertada de los factores H e I, de tal modo que sea posible distinguir

entre superficies activadoras y no activadoras, como por ejemplo: zimosan y eritrocitos de conejo se encontrarían entre las primeras y eritrocitos de carnero entre las últimas.

Un resumen de las nuevas proteínas que forman parte de la vía alternativa y sus funciones se presentan en la tabla 3.

I.7. MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE COMPLEMENTO POR LA VIA ALTERNATIVA. DIFERENTES COMPONENTES IMPLICADOS.

En la activación de complemento por la vía alternativa, como hemos indicado anteriormente, es muy importante la unión del C3b generado a la partícula en cuestión. En dicha unión van a intervenir tanto el C3 como los componentes de la superficie activadora o no activadora, por ello consideramos interesante hacer una pequeña descripción de la proteína C3 y los fragmentos que se originan en la activación.

I.7.1. C3 : Cadenas, fragmentos y sitios funcionales.

Esta proteína está formada por 2 cadenas : la cadena 1 de peso molecular 110.000 y la cadena 2 de peso molecular 70.000, que permanecen unidas por tres puentes disulfuro.

El ataque enzimático de la C3 convertasa afecta solamente a la cadena 1 originando un pequeño péptido denominado C3a y el resto de la molécula que se denomina C3b (119, 120, 121) (Fig.4). Como consecuencia de la acción enzimática aparece sobre C3b un "sitio de unión lábil", que se puede unir a sitios aceptores de

TABLA 2

FACTORES REGULADORES DE LA ACTIVACIÓN DE COMPLEMENTO POR LA VIA ALTERNATIVA				
FACTOR ESTABILIZADOR	RESULTADO	FACTOR DESESTABILIZADOR	RESULTADO	
A. FASE FLUIDA				
Properdina(P)	Estabiliza- ción de C3bBb	factor H	C3b y Bi	
Factor nefrítico (C3NeF)	Estabiliza- ción de C3bBb	factor H	C3b Bb	
B. PARTICULA				
Contenido en ácido siálico	bajo	Captación de C3b	Competencia entre factor H y factor B	C3bBb
	alto	Captación de C3b	Competencia entre factor H y factor B	C3b y Bi

diferentes tipos de células, y un "sitio de unión estable", que se une a receptores específicos denominados receptores de inmunoadherencia, presentes en algunos tipos celulares como eritrocitos humanos, linfocitos B y macrófagos.

Sobre el fragmento C3b actúa otra proteína reguladora denominada factor I (122, 123), produciendo dos nuevos fragmentos llamados C3c y C3d (124).

En los procesos de activación de complemento que con anterioridad hemos descrito, el C3b se une a las células o partículas activadoras por el "sitio de unión lábil", ya que una forma de detectar estas moléculas sobre las células es la realización de rosetas con hematíes humanos del grupo O, las cuales se originan cuando el "sitio de unión estable" del C3b está libre para unirse al receptor de inmunoadherencia. (Fig. 5).

I.7.2. Componentes de membrana que participan en la unión de C3b.

En el momento presente se desconoce la naturaleza química de las estructuras de membrana que producen la activación de complemento, y si dichas estructuras son las mismas que aquellas que pueden unir pasivamente el C3b. Existen diferentes hechos que apuntan a la participación de diferentes componentes en el fenómeno. Capel et al. (125) presentan algunas evidencias indirectas que indican que el C3b se une por su parte lábil a estructuras de membrana (aceptores), que son glicoproteínas que contienen al menos 10 residuos de azúcares por molécula y uno de los cuáles es N-acetil-galactosamina. Estas glicoproteínas pueden ser también

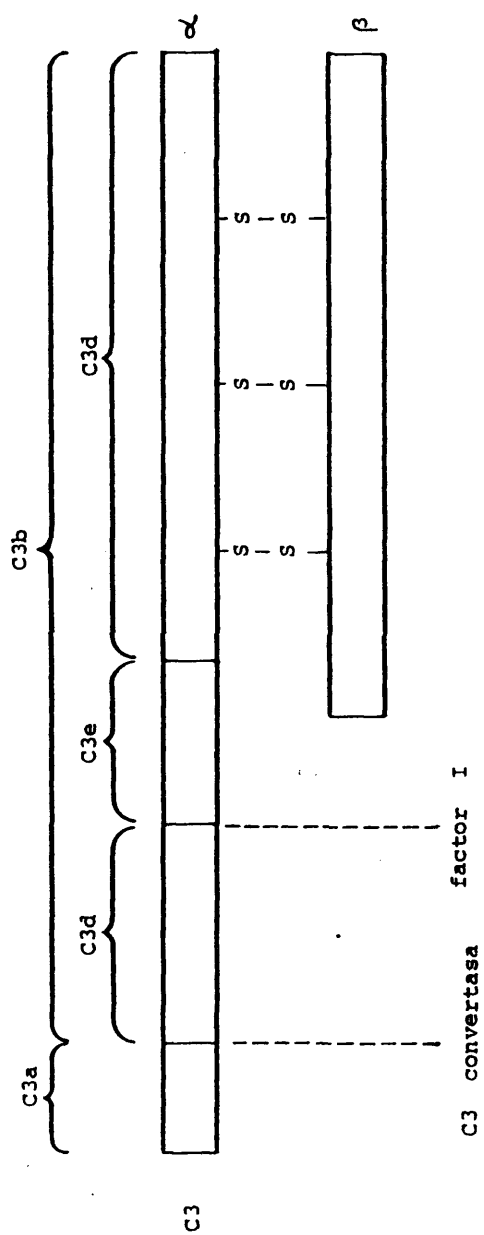


Figura 4. CARACTERISTICAS DE C3.

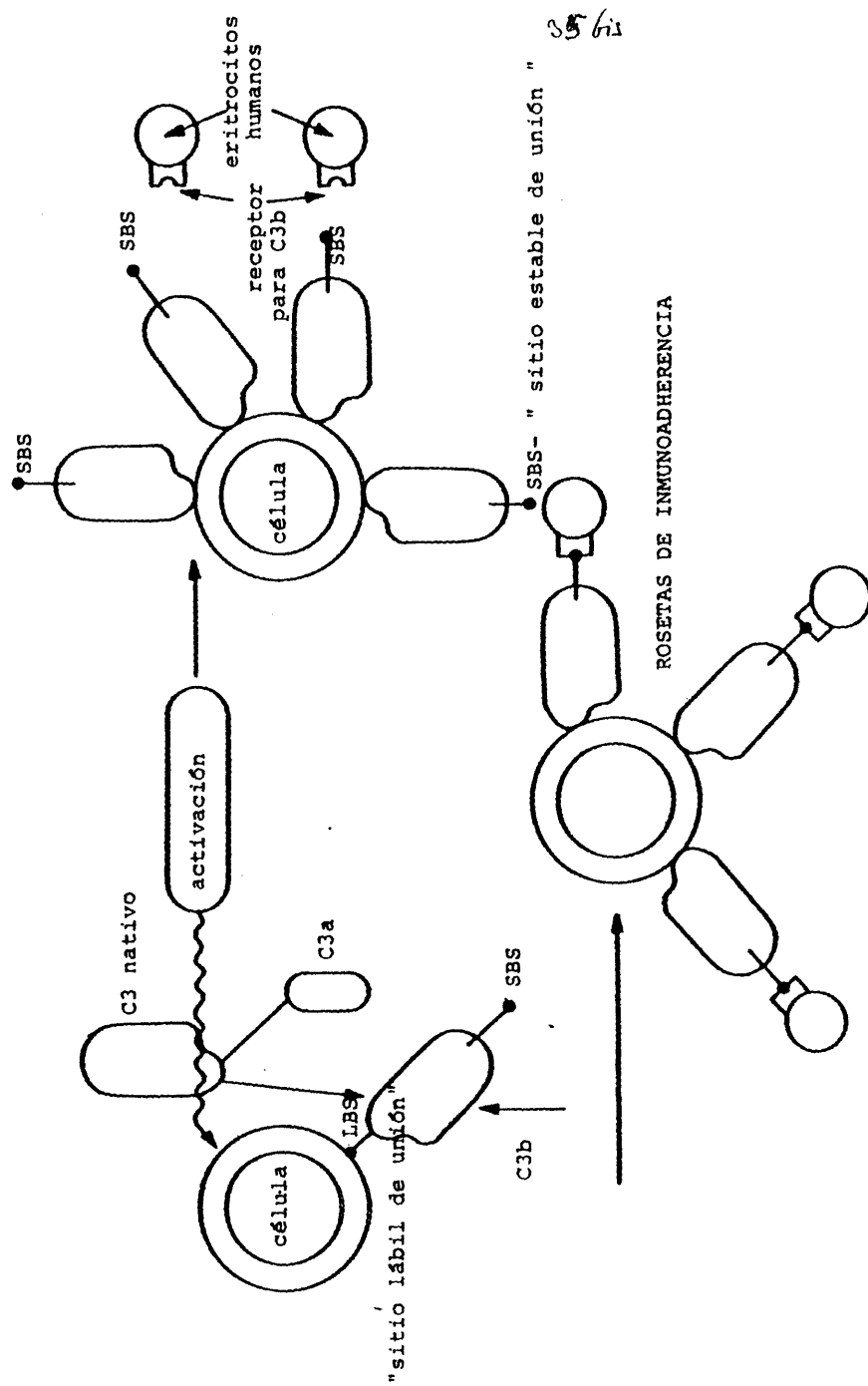


Figura 5. FORMACION DE ROSETAS DE INMUNOADHERENCIA.

las inmunoglobulinas. Así mismo, se ha descrito en el caso de lipopolisacaridos que el potencial activante de complemento de estas moléculas reside en los residuos de azúcares (126). Otros autores consideran el ácido siálico como elemento fundamental en el fenómeno de activación, ya que la eliminación de dicho ácido de los hematies de carnero convierte a estos en superficies activadoras del sistema de complemento (127). La carga eléctrica no parece afectar a la activación ya que el tratamiento de estos hematies con Na IO_4 que convierte el ácido siálico en ácido heptulónico, sin disminución de la carga negativa, produce el mismo efecto que la eliminación del ácido siálico por tratamiento con neuraminidasa (127). En contraste, Pangburn et. al. (128) consideran que el ácido siálico funciona como regulador de la activación de complemento por la vía alternativa, en algunas ocasiones, pero no en todas; una baja densidad de ácido siálico no es condición suficiente para dicha activación. Estas conclusiones se basan en que a pesar de encontrar resultados parecidos con hematies de carnero tratados con neuraminidasa (129); también encuentran (128) que la unión de un lipopolisacarido de *Escherichia Coli*, cepa 04, a hematies de carnero, transforma a estos en superficies activadoras, manteniéndose el contenido en ácido siálico.

Otros autores han considerado los fosfolípidos como punto importante en la activación de complemento por membranas celulares. Cunningham et. al. (130), los que han encontrado trabajando con liposomas, que los lípidos cargados positivamente y los glicolípidos son importantes para la activación, sugieren la importancia de la fluidez de la membrana en este fenómeno, (fluidez

que viene determinada por la composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos y el contenido de colesterol), ya que la longitud y grado de saturación de los ácidos grasos, así como la relación colesterol/fosfolípidos influye en la capacidad que los liposomas tienen de activar complemento.

1.7.3. Restricción del control del factor H sobre la C3 convertasa unida a las partículas activadoras.

La capacidad discriminatoria entre superficies activadoras y no activadoras del complemento parece residir en la facilidad de escape de la C3 convertasa, unida a dichas superficies, a los mecanismos de control de los factores H e I (Fig. 6). Mientras que sobre las superficies no activadoras el C3b es realmente inactivado por las proteínas de control, la proporción de inactivación del C3b sobre las activadoras está marcadamente reducida. La restricción del control parece ser debida a la baja unión entre el factor H y C3b sobre las activadoras, (129, 131, 132, 133); de tal modo que se ha propuesto que la interacción de C3b unido a ciertas estructuras de la superficie disminuyen la afinidad de C3b por el factor H, sin alterar la existente entre C3b y factor B (129, 134). Fearon y Austen (127, 134, 135), consideran que el contenido en ácido siálico de las partículas tiene un papel importante en esta restricción del control del factor H, mientras que Pangburn y Muller-Eberhard (128, 129) enfocan el problema hacia estructuras de membrana, (que se pueden poner de manifiesto por la eliminación del ácido siálico) a

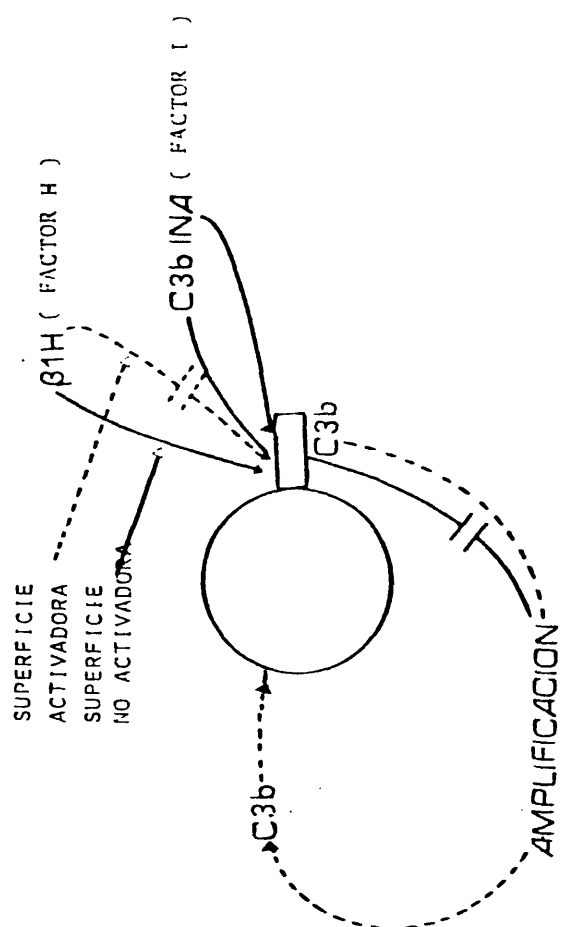


Figura 6. CONTROL DE LAS SUPERFICIES SOBRE LA ACTIVACION DE COMPLEMENTO.

38673

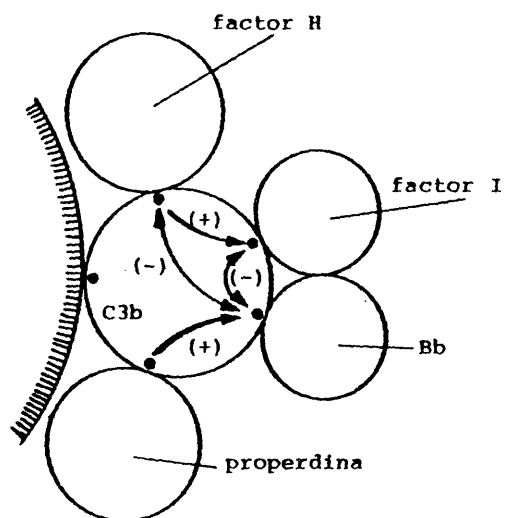


Figura 7. SITIOS DE UNION EN C3b.

(+) - cooperación positiva
(-) - cooperación negativa

las que consideran responsables de dicha restricción y a las que denominan antagonistas del factor H (Fig. 7). Estos autores proponen la existencia de una serie de equilibrios entre diferentes estados conformacionales, de tal forma que en las superficies activadoras existiría un antagonista del factor H que favorecería aquel estado conformacional en el cual esta enzima reguladora no tiene sitio de unión. (Fig. 8).

I.7.4. Naturaleza química de la unión entre el C3b y la partícula activadora.

La formación de la enzima inicial de la vía alternativa y la generación de un "sitio lábil de unión" en C3b, puede estar íntimamente ligado a la presencia de un puente tio-éster en la molécula de C3. Este sitio de unión en el C3b fué descrito en 1966 (136), pero la base química de la unión no está aún clarificada totalmente. No obstante, dos hechos han ayudado a clarificar la naturaleza química de este sitio de unión:

- C3b, probablemente, se une a las superficies por una unión covalente, en la que un grupo - COOH forma un éster con un -OH de la superficie (137, 138).

- parece posible que C3b contenga un grupo sulfhidrilo no detectable en C3 nativo (139).

Se ha postulado que estos dos grupos reactivos forman un tioéster en C3 nativo (139, 140).

Basándose en estos hechos y en que el tratamiento con aminas, tales como la hidrazina ó la metilamina, produce una molé-

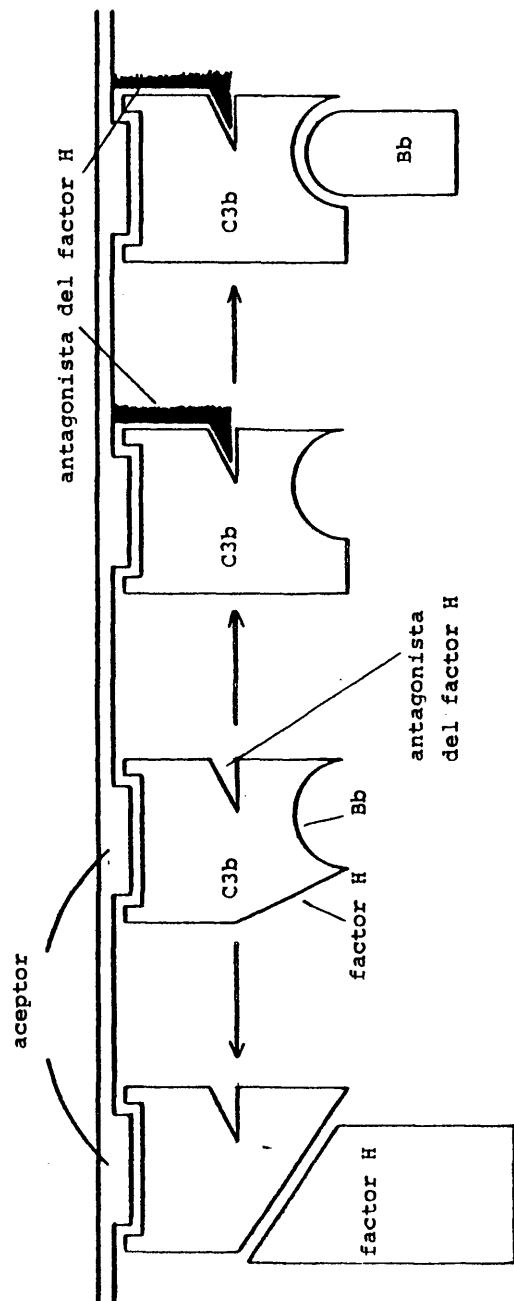


Figura 8. POSIBLES ESTADOS CONFORMACIONALES DE C3b.

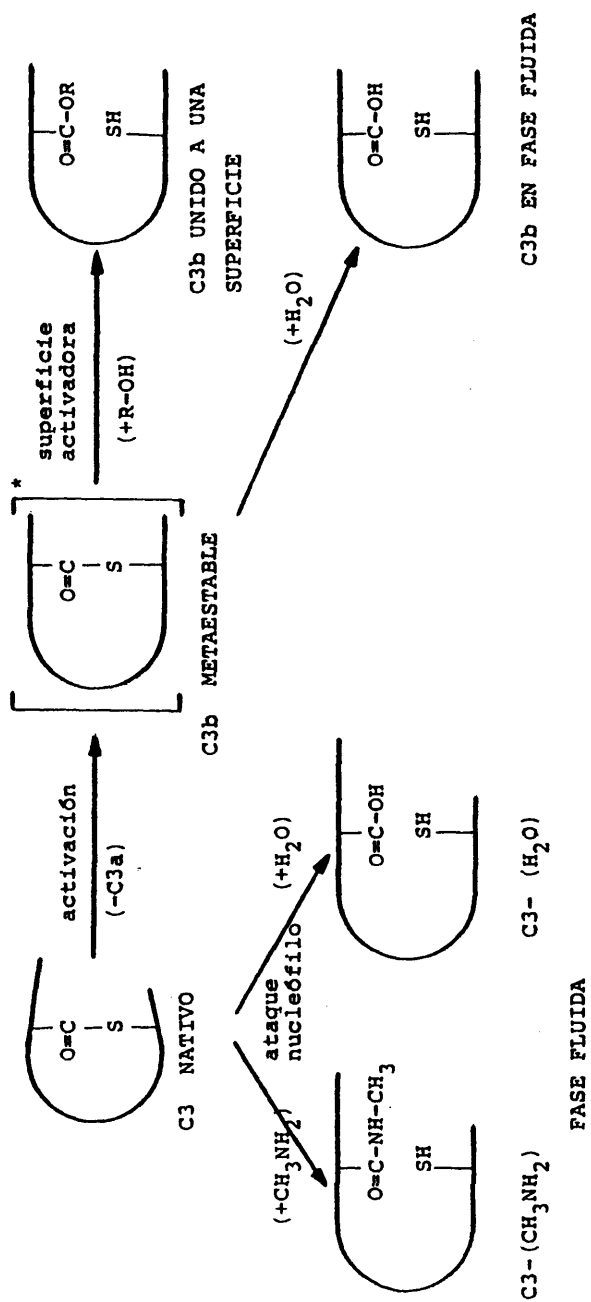


Figura 9. NATURALEZA QUIMICA DE LA UNION ENTRE C3b Y LA SUPERFICIE ACTIVADORA.

cula de características funcionales análogas a C3b, pero sin liberación de C3a, Pangburn y Müller-Eberhard (141) postulan un posible mecanismo de unión del C3b a las superficie diana (Fig. 9).

La otra cuestión que estos autores plantean es que es posible originar una nueva forma del C3 nativo, con las mismas propiedades funcionales que el C3b en cuanto a la formación de la C3 convertasa (afinidad por el factor H, afinidad por el factor B, etc.) por ataque nucleófilo al enlace tioester. Considerando que quien mejor puede llevar a cabo este ataque nucleófilo es una molécula de H_2O , cuya concentración en el plasma es 55M.

Lo importante de estos resultados es que sugieren que la C3 convertasa inicial de la vía alternativa (114, 142, 143) puede formarse con C3 nativo, sin proteólisis, por ataque de varios nucleófilos, como p.e., el H_2O . Como ya sabemos, esta C3 convertasa inicial genera por ruptura proteolítica C3b, que es capaz de unirse a las superficies receptivas y originar la C3 convertasa de amplificación, siguiendo la cascada de activación de complemento.

Esta hipótesis es consistente con el hecho de que el C3 nativo contiene un grupo carbonilo activo, probablemente en forma de tioester, que puede reaccionar con H_2O para originar una forma de C3 funcionalmente análoga al C3b; o que se puede transformar en C3b por ataque enzimático, permitiendo al C3b formar un ester con grupos hidróxilo de la superficie diana, quedando un grupo $-SH$ libre y detectable en C3b (139).

42

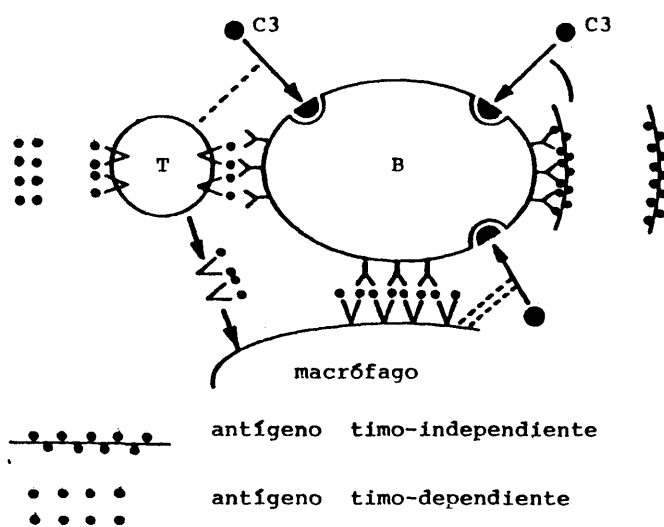


Figura 10. HIPOTESIS DE DUKOR.

I.8. FUNCIONES CLÁSICAS ASIGNADAS AL SISTEMA DEL COMPLEMENTO.

La función totalmente aceptada del sistema del complemento es lisar aquellas partículas que han producido su activación. Además se han asignado a este sistema del complemento una serie de funciones que pasamos a enumerar.

I.8.1. Fagocitosis

Existe una gran evidencia tanto "in vivo" como "in vitro" de que C3 e IgG aumentan la fagocitosis. Este fenómeno ocurre en dos pássos, Mantovani et al. (144) han estudiado el papel de los receptores para el fragmento Fc de la IgG y para C3 en estas dos fases del proceso, concluyendo que el C3 unido a la partícula facilita la unión con el fagocito, mientras que la IgG es la responsable de la ingestión.

Análogamente, Huber et al. (145) han demostrado que C3 e IgG actúan sinérgicamente en la fagocitosis, de forma que el fragmento Fc estimula la interiorización de la partícula pero es menos eficiente en la unión, mientras que C3 media la unión entre el fagocito y la partícula pero no promueve la ingestión.

No obstante es posible la ingestión de la partícula en ausencia de anticuerpo siempre que sobre la superficie existan moléculas que puedan inducir fagocitosis no específicamente. Esto es de gran importancia ya que como hemos visto anteriormente existen partículas que son capaces de activar el sistema del complemento en ausencia de anticuerpos.

I.8.2. Daño tisular

Algunos componentes del complemento después de ser activados actúan como mediadores inflamatorios. C5a interacciona con polimorfonucleares tratados con citocalasina B y provoca liberación de enzimas hidrolíticos (146, 147).

C3a y C3b interacciona con macrófagos peritoneales de cobaya y ratón liberando hidrolasas lisosomales (148). Este fenómeno puede explicar porque los macrófagos, leucocitos y mastocitos causan daño celular y degradación en los lugares en que se produce una inflamación crónica.

También se produce un sistema de amplificación ya que estas hidrolasas liberadas son capaces de activar complemento (149,140) produciendo productos activados que de nuevo facilitan la liberación de nuevos enzimas.

I.8.3. Control del tráfico de células y complejos inmunes.

C3 y los receptores de complemento parecen tener un papel en la localización folicular del antígeno (151), es decir, conducen a las sustancias antigénicas (en presencia de anticuerpos), hacia determinadas áreas de los órganos linfoides, presumiblemente para la inducción de la respuesta inmune. Dukor et al. (152), y Papamichail et al. (153) defienden esta función del C3 basándose en que la descomplementación en ratones "in vivo" con veneno de cobra (CoF) impide que la globulina humana inyectada se localice en las áreas foliculares y en los centros germinales del bazo.

1.8.4. Citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC).

En este tipo de citotoxicidad la célula efectora conocida como célula K (Killer), es capaz de matar células dianas que estén recubiertas de anticuerpo (62, 154, 155, 156). La célula efectora tiene receptores para el fragmento Fc de la célula IgG y para C3 (157), a través de los cuales se une a la célula diana.

Ig G es quien media realmente este tipo de reacciones citotóxicas, ya que C3, en ausencia de IgG, es incapaz de mediarla (158, 159).

El papel del C3 parece ser aumentar el efecto lítico probablemente porque aumenta la unión entre las células efectora y diana. También se ha demostrado que el complejo de ataque a la membrana C5b-9 tiene un papel en este tipo de citotoxicidad (160), como veremos mas adelante.

1.8.5. Inducción de la respuesta inmune.

La sugerencia de que el C3 puede jugar un papel en la respuesta inmune se basa en los experimentos de Pepys et al. (161, 162, 163). Demuestran que la inyección de CoF en ratón suprime la respuesta IgG, IgA e IgE a antígenos timo-dependientes, pero no afecta a la de timo-independientes. También se ha demostrado que la localización de IgG agregada ó polisacarido S-III en órganos linfoides se modificaba cuando los ratones eran previamente tratados con CoF (152, 153). Se ha postulado que las células que

unen el antígeno tienen un importante papel en el reclutamiento de linfocitos B y que su función es presentar el antígeno a las células inmunocompetentes (164). Como recopilación de estos datos, Nussenzweig et al. (165), consideran que la eliminación de C3 actúa sobre el tráfico de linfocitos B y de los complejos antígeno-anticuerpo-complemento, repercutiendo en la respuesta inmune. Según esto, los receptores de complemento servirían para concentrar el antígeno inespecíficamente, en forma de estos complejos, sobre linfocitos B y macrófagos, teniendo en cuenta que la interacción entre receptores de complemento y C3 asociado a complejos, no produce entrada de estos en las células, si IgG no está presente, lo cual es normal en los estadios iniciales de la respuesta inmune.

Esta hipótesis está sustentada por los descubrimientos de Møller y Continho (166), quienes encuentran que la respuesta a LPS unido a C3 como mitógeno de células de bazo "in vitro" necesita menos cantidad de LPS para obtener una respuesta máxima que LPS solo.

Por otro lado, Dukor y Hatmann (167) proponen una hipótesis diferente sobre el papel del C3 en la respuesta. Basándose en la teoría de las dos señales para la activación de linfocitos B, consideran que la interacción C3-receptor de complemento, sería la segunda señal. Apoyan su teoría (Fig. 10) en el descubrimiento de que muchos mitógenos y antígenos timo-independientes son capaces de activar directamente el sistema del complemento. Además existen una serie de experimentos que no son explicables según la hipótesis de Dukor:

- Pacientes homocigóticos deficientes de C3 tienen niveles normales y responden a antígenos timo-dependientes "in vitro" en ausencia de suero (169). De todos modos, este dato no es concluyente ya que las células en cultivo pueden sintetizar C3 (170).

- La eliminación de células con receptores para complemento, en linfocitos del conducto torácico de ratas primadas, disminuye la respuesta IgG pero no la hace desaparecer (171).

- No todos los antígenos ni todos los mitógenos tienen capacidad de activar el sistema del complemento (172, 173, 174).

I.9. COMPLEMENTO Y HLA.

El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) se define como el conjunto de genes, localizados muy próximos unos a otros en un pequeño fragmento de un cromosoma y que están involucrados en la definición de lo "propio" y reconocimiento de lo "no propio", es decir, en el control de los procesos inmunológicos. Es posible que una función altamente especializada como es el reconocimiento de estructuras "extrañas" y el control de mecanismos específicos de defensa, requiera una regulación tal que solo pueda ser realizada por genes localizados muy proximalmente unos de otros. Desde el punto de vista genético este complejo es extremadamente complicado. Es altamente polimórfico, ya que muchos de sus loci constituyentes tienen numerosos alelos y existen innumerables combinaciones génicas. Recibe diferentes nombres según las especies animales denominándose H-2 en el caso del ratón y HLA en el caso de los humanos.

El importante papel de esta región del DNA en los fenómenos inmunológicos ganó una nueva dimensión cuando se descubrió la existencia de ligamiento entre HLA y los genes que controlan la síntesis del sistema del complemento.

Primeramente en 1974, Allen describió ligamiento genético entre HLA y el locus del factor B de la vía alternativa (175), y Fu et al. (176) demostraron la existencia de ligamiento entre HLA y los genes que controlan la síntesis de C2. Posteriormente, en 1975, Rittner et al. (177) demostraron que C4 estaba codificado en el MHC. C4 muestra un alto grado de polimorfismo en varias especies animales. O' Neill et al. (178) describieron que el polimorfismo de C4 era controlado por dos loci muy ligados genéticamente: F (C4a) y S (C4b), y actualmente Roos et al. (179) dan una base molecular para el modelo de dos loci para C4 en humanos.

La localización de los genes que codifican para C2, C4 y factor B en la región HLA es particularmente interesante, ya que los productos de estos tres genes activan C3 que es la proteína central en la cascada de activación del complemento.

Este mismo fenómeno se ha descrito en otras especies: ratón, cobaya y mono. En ratón, Hinzová et al. (181) en 1973, localizan estos genes en la región Ss-Slp, y en 1975 Hansen et al. (182) describen que la proteína Ss es un componente del sistema del complemento.

Hemos visto que existe una relación estructural entre los genes que controlan la respuesta inmune y los que controlan la síntesis de los componentes tempranos del sistema del complemen

to, pero la importancia funcional y la exacta naturaleza de esta relación deberá ser objeto de nuevos estudios en el futuro.

I.10. ACTIVACIÓN DE COMPLEMENTO POR CÉLULAS Y MICROORGANISMOS.

I.10.1. Vía clásica.

Los activadores del complemento por la vía clásica primeramente descritos fueron los complejos inmunes donde el anticuerpo era IgG ó IgM; ya que el fragmento Fc de estas inmunoglobulinas, después de unirse el antígeno sufre un cambio conformacional que posibilita su unión con el Clq.

Se ha encontrado que existen seis sitios de unión para IgG por molécula de Clq. Posteriormente, se ha visto que el Clq consta de 6 unidades no unidas covalentemente, cada una de las cuales tiene un sitio de unión para la inmunoglobulina (183). Las subclases de IgG que son capaces de unirse a Clq son IgG1 ó IgG3.

Existen sustancias, diferentes de los complejos antígeno-anticuerpo, que son capaces de activar complemento por la vía clásica. En la tabla 4 presentamos diferentes agentes, células o microorganismos capaces de activar la vía clásica, independientemente de la presencia de anticuerpos. Es bien conocido que hematies de carnero no son lisados por complemento en ausencia de anticuerpos específicos, sin embargo Loos y Thesen (184) vieron que la unión de grupos TNP a estos eritrocitos los vuelve sensibles a la lisis por suero humano normal (SHN) autólogo, indepen

dientemente de la presencia de anticuerpos. En la misma línea Hughes - Jones et al. (185) obtuvieron resultados similares con hematies humanos, tratados con glutaraldehído.

También nos parece interesante señalar los datos de Fust et al. (186); y Kitamura et al. (187) sobre la presencia de C1 activado sobre la superficie de células mononucleadas de sangre periférica; C1 que puede seguir la activación por la vía clásica.

1.10.2. Vía alternativa.

La vía alternativa es, por ella misma un mecanismo independiente de la presencia de inmunoglobulinas, por lo que las superficies activadoras de esta vía llevan componentes intrínsecos capaces de fijar la C3 convertasa y seguir la cascada de activación. Entre estos componentes se encuentran zimosan, inulina y algunas endotoxinas bacterianas (188). En la tabla 5 presentamos un pequeño resumen de algunas células, componentes celulares y microorganismos que tienen capacidad de activar el sistema del complemento por la vía alternativa.

1. 11. ACTIVACIÓN DE COMPLEMENTO POR CÉLULAS A TRAVÉS DE LA VÍA ALTERNATIVA. POSIBLES PAPELES BIOLÓGICOS DE ESTA ACTIVACIÓN.

En esta línea, uno de los descubrimientos más interesantes fué la descripción de la activación de complemento por célu

TABLA 4AGENTES QUE ACTIVAN COMPLEMENTO POR LA VÍA CLÁSICA

- Algunos géneros de ciertas bacterias Gram-negativas (E. Coli, Klebsiella).
- Mycoplasma pneumoniae.
- Retrovirus.
- Células infectadas con retrovirus.
- Eritrocitos tratados con TNP.
- Eritrocitos tratados con glutaraldehído.

52/11

TABLA 5

AGENTES QUE ACTIVAN COMPLEMENTO POR LA VÍA ALTERNATIVA

- Bacterias Gram-negativas.
- Bacterias Gram-positivas (neumococos, estreptococos y estafilococos).
- Tripanosomas.
- Entamoeba histolítica.
- Candida
- Homogeneizado de tejido muscular (suero autólogo).
- Filamentos del citoesqueleto (suero autólogo).
- Membranas liposómicas.

las normales y tumorales en suero autólogo y heterólogo. Primeramente, Platts - Mills e Ishizaka en 1974 (189) describieron la capacidad de eritrocitos y linfocitos de conejo de activar complemento por la vía alternativa en presencia de suero humano normal (SHN).

Posteriormente, se describió activación de complemento autólogo por diferentes tipos de células transformadas: células de carcinoma nasofaríngeo (190), células de linfoma de Burkitt y de mononucleosis infecciosa (191,192). Siguiendo en esta línea, en 1978, McConnell et al. (193), encuentran que la activación de complemento por líneas linfoblastoideas humanas B está directamente relacionada con la transformación por EBV, de tal modo que las EBV+, tienen una mayor capacidad de activar el sistema del complemento que las EBV-, y Sisson et al. (194), describieron que células Hela adquirirían la capacidad de activar complemento cuando eran infectadas con el virus del sarampión. En 1981, McConnell et al. (195) se plantean si el cultivo prolongado de estas células "in vitro" no será el responsable del proceso de activación que describen y trabajan con células frescas de linfoma de Burkitt, encontrando este mismo fenómeno, que anteriormente habían estudiado en estas células mantenidas en cultivo. También se ha descrito la activación de complemento por diferentes tipos de leucemias (196, 197). Estos datos y el hecho de no encontrar activación de complemento por células normales (197) incubadas con SHN autólogo, hace que estos autores postulen que la activación de complemento por células alteradas (por infección viral o transformación tumoral) es un mecanismo de defensa del propio

organismo, por el cual estas células son eliminadas o controladas "in vivo" antes del desarrollo de células T citotóxicas específicas, sugiriendo que la vía alternativa del complemento puede discriminar entre células "propias" normales y anormales o superficies celulares extrañas.

Paralelamente en el tiempo, Kierszembraun y Budzo describieron la activación de complemento por linfocitos normales, utilizando sueros normales heterólogos como fuente del mismo. En 1977 (198), describen la citotoxicidad de diferentes tipos de sueros sobre timocitos de rata, y en este mismo año (199), con linfocitos de ratón y suero de cobaya, encuentran que solamente linfocitos T procedentes de diferentes órganos linfoides y timocitos son lisados por complemento de cobaya. En 1978 (200), identifican una subpoblación de timocitos de rata sensible al complemento de cobaya, cuya eliminación hace desaparecer la respuesta a PHA y a ConA. El hecho más importante descrito en este trabajo, es la variación cuantitativa de las células susceptibles a la citotoxicidad del suero de cobaya con la edad del timo, lo que les lleva a especular sobre la posibilidad de que la reactividad con el complemento de cobaya puede definir un marcador de diferenciación en la membrana citoplasmática de los timocitos. Continuando con esta hipótesis de trabajo, en 1979 (201), describen que a causa de la transformación blástica inducida por mitógenos, los linfocitos T de ratón pierden la sensibilidad a la citotoxicidad por complemento de cobaya. Ante esto, concluyen que la activación de complemento por células puede utilizarse como marcador de los cambios que a nivel de la membrana celular ocurren durante la diferenciación.

Resultados análogos de activación de complemento en sistemas heterólogos han encontrado Eidinger et al. (202, 203).

Hasta este momento hemos visto la activación de complemento en sistemas heterólogos y en sistemas autólogos en el caso de células transformadas. En 1979, Wilson et al. (204) describen la activación de complemento autólogo por células normales de conejo.

Estos autores detectan C3 principalmente sobre células B, aunque linfocitos T periféricos y timocitos también son capaces de fijar los productos de activación de C3 sobre su membrana.

La descripción del fenómeno de activación de complemento por células en sistemas autólogos, sin llegar a producirse citolisis, plantea la cuestión de un posible papel del complemento distinto de la función lítica clásica. En el momento actual, existe alguna evidencia acerca de que algunos componentes del complemento están asociados "in vivo" con la membrana de los linfocitos. En 1976, G. Fust et al. (186) describieron la presencia de C1 activo sobre la superficie de linfocitos humanos periféricos, presencia que en 1978 (187) fué corroborada por Kitamura et al.

En cuanto a los últimos componentes del sistema del complemento desde C5b a C9, que constituyen el complejo de ataque a la membrana (MAC), Sundsmo et al. han hecho un estudio sobre su expresión en linfocitos de sangre periférica con el fin de ver la naturaleza e identidad de los mecanismos de citotoxicidad, que son desconocidos, ya que los efectos de las células citotóxicas y el complemento sobre las membranas celulares son similares.

Estos autores (205) trabajando con linfocitos de sangre periférica ven que un 27 % de linfocitos tienen nuevos determinantes antigénicos, que denominan neoantígenos y que identifican en el complejo C5b-9. Estos nuevos determinantes se hallan principalmente sobre linfocitos B. Posteriormente (206), describen que la expresión de los neo-Ag sobre linfocitos se puede prevenir recogiendo la sangre con EDTA 20 mM, concluyendo que solo un pequeño porcentaje de PBL (4%) son positivos para estos antígenos en la sangre circulante, y que según el método de recogida de la sangre este porcentaje puede aumentar.

Una breve incubación de los linfocitos con suero autólogo ó bien una incubación más prolongada en medio sin suero induce la expresión del complejo de ataque a la membrana, observándose la síntesis de C5 por los linfocitos. Una vez descrita la presencia del MAC en linfocitos, estos mismos autores (160) estudian su papel en citotoxicidad, encontrando que el 60% de los linfocitos que son efectores en citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC) expresan estos neoantígenos, visualizando estos con sueros fluoresceinados en la zona de unión entre la célula diana y la efectora. El número de células positivas para estos nuevos determinantes antigénicos aumenta con la estimulación mitogénica con PHA y con la estimulación alogénica. Ante estos datos concluyen que los linfocitos citotóxicos pueden ejercer su función a través del complejo de ataque a la membrana (MAC), dejando abierta la cuestión de como los linfocitos se protegen a si mismos contra el efecto lítico de este complejo.

Finalmente, este año Wilson et al. (207) han detectado la

presencia de diferentes componentes del complemento sobre linfocitos de sangre periférica, siendo el más predominante C4 que se encontraba en un 11% de linfocitos, seguido del factor H, presente en un 9%. Clq, C3 y C6 existían en un porcentaje menor y no detectaron la presencia de C2, C5, C7, C8 y factor B. Todos estos componentes unidos a la membrana celular se detectaron sobre linfocitos B.

Después de descrita la existencia de componentes del complemento en las membranas citoplasmáticas de los linfocitos, la cuestión que se plantea es la función inmunológica de este. A este respecto, Sundsmo et al. (208) describen que C5 es sintetizado durante la estimulación con PHA y en cultivo mixto de linfocitos y sugieren que este componente tiene un papel en la activación de linfocitos, ya que un antisuero anti-C5 inhibe la proliferación. Y Dierich y Landen (209) establecen que los componentes del complemento sobre las membranas celulares pueden actuar como puentes que fortalezcan las interacciones entre células, las cuáles son necesarias para un gran número de procesos biológicos.

MATERIALES Y METODOS.

II.1. MATERIAL PARA CULTIVOS CELULARES

- Placas estériles de cultivo de 96 pocillos fondo plano.
- Frascos estériles de cultivo de 25 cm².
- Frascos estériles de 250 cm².
- Placas de Petri 10 x 35 mm.

pertenecientes indistintamente a las siguientes casas:

- * Falcon Oxnard, Ca. USA.
- * Sterilin. Teddington, Inglaterra.
- * Nunc. Dinamarca.
- * Costar. Cambridge, ma. USA.
- * Greiner. Soria-Greiner. Madrid. España.
- Colector de sobrenadantes de cultivo: SKATRON AS. Flow.
Flow Lab. Lierbyen. Noruega.
- Colector de sobrenadantes. TITERTEK.
Folw Lab. Irvine. USA.
- Cámara de flujo laminar.
Telstar SA. Tarrasa. España.
- Estufa de cultivo de CO₂. Forma Scientific. Marietta. USA.
- Contador Gamma 4000. Beckman Ins. Inc. Irvine. Ca. USA.

II. 2. REACTIVOS

- Medio RPMI 1640. Microbiological Associates. Md. USA.
- L-Glutamina. Flow Lab., Irvine. USA.

- Penicilina-Estreptomicina. Difco. Lab. Detroit. Mi. USA.
- Albúmina bovina. Sigma Chem. Co., St. Louis. Mo. USA.
- Suero Bovino fetal. Gibco. Grand Island. NY. USA.
- Ficoll metrizato sódico. Lymphoprep. d.1077. Nyegaard&Co. Oslo. Noruega.
- HEPES 1M. Flow Lab. Irvine. USA.
- Fitohemaglutinina. Difco Lab. Detroit, Mi. USA.
- Percoll. T.M. Pharmacia Fine Chemicals. Uppsala. Suecia.
- Antisueros antihemáticos bovinos IgG.
Cappel Lab. Inc. Cochranville. Pa. USA.
- Antisueros antihemáticos bovinos IgM.
Cappel Lab. Inc. Cochranville. Pa. USA.
- Hanks medio. Difco Lab. Detroit. Mi. USA.
- Heparina. Laboratorio Leo, Madrid. España.
- Mitomicina C. Sigma Chem. Co., St. Louis. Mo. USA.
- Neuraminidasa de Vibrio Cholerae. VCN Behring Diagnostics, Somerville, N.Y. USA.
- Nylon. Leuko-Pak. Travenol. Los Angeles. USA.
- Timidina H³. Radiochemical Centre. Amersham.
- Agarosa. IBF. Pharmindustrie. Villeneuve La Garenne. Francia.
- Sueros antiinmunoglobulinas fluoresceinados.
Hyland. División Travenol Lab. Inc. Costa Mesa. USA.
- Sueros F (ab¹)₂ antiinmunoglobulinas fluoresceinados.
Cappel Lab. Inc. Cochranville. Pa. USA.
- Sueros anti-C3 humano fluoresceinados
Behring Institut. Behringwerke AB. Marburg. Alemania.
- Sueros F (ab¹)₂ anti-C3 humano fluoresceinado.

Cappel Lab. Inc. Cochranville. Pa. USA.

- Sueros anti-C 3. Behring Institut. Behringwerke AG. Marburg.

Alemania.

- Sueros anti-inmunoglobulinas marcados con peroxidasa.

Nordic. Tilburg. Berchen. Londres. Inglaterra.

- Solución de Para-rosanilina. Sigma. n°3750. St. Louis. USA.

- Solución de Butirato de α - naftilo. Sigma. St. Louis. Mo. USA.

- Dimetil Formanida. Meck. Darmstadt. Alemania.

- Verde Metilo. Fisher. N° 76110. USA.

- Azul Tripan. Fluka. AG. Chemische Fabrick, CH-9470. Buchs. SG.

II.3. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

En el presente trabajo se ha utilizado el siguiente medio de cultivo:

RPMI 1640, suplementado con distintas concentraciones de suero bovino fetal (FCS), glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, 100 U.I. de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomicina. Al medio así preparado lo denominaremos "RPMI completo".

II.4. PREPARACIÓN DE CELULAS LINFOIDES

Se obtuvieron a partir de los siguientes órganos linfoides: timo, bazo, amígdalas y sangre periférica.

Las células del timo fueron obtenidas de pacientes jóvenes operados a corazón abierto. Las amígdalas se obtuvieron de pacientes jóvenes, en los cuáles la amigdolectomía estaba indicada te-

rapeuticamente. Se rechazaron aquellas amígdalas de aspecto muy inflamado o purulento.

A partir de éstos órganos, las células se dispersaron en suero salino, descartando el sedimento depositado a 1 g durante 5 minutos. La suspensión celular así obtenida se lavó 6 veces con suero salino suplementado con 1% de antibióticos y después se resuspendió en el medio apropiado.

Linfocitos de sangre periférica (PBL) se obtuvieron a partir de sangre con heparina, de donantes voluntarios sanos siguiendo el método de Boyum et al. (210). Esta sangre se diluyó con un volumen igual de suero salino y se colocó en tubos de cristal de 10 ml, lentamente sobre 3 ml de Ficoll-metrioato sódico. El gradiente así formado se centrifugó a 450 g durante 40 min. A continuación se recogió la interfase que contenía principalmente linfocitos. Estas células se lavaron dos veces con tampón fosfato salino 0.15M pH 7.4 que contenía 0,2 % de albúmina bovina (PBS/BSA), se suspendieron en medio y se contaron. Un 90-95 % de las células eran viables, determinándose la viabilidad mediante el método de exclusión de Azul Tripan.

Las células del bazo, obtenidas tras su dispersión en medio de cultivo, se sometieron a un gradiente de Ficoll- metrioato sódico, para eliminar los hematies y luego se siguió el mismo procedimiento descrito para los linfocitos de sangre periférica.

II.5. ELIMINACIÓN PARCIAL DE CÉLULAS ADHERENTES

II.5.1. Tratamiento con polvo de hierro.

1 mg/ml de polvo de hierro se añadió a la sangre total con heparina y la mezcla se incubó a 37 °C durante media hora en un baño con agitación. El polvo de hierro y las células que lo habían fagocitado se retuvieron con un imán y la sangre se diluyó en un volumen igual de suero salino. A continuación, se sometió a un gradiente de Ficoll-metrioato sódico y se trató análogamente a como hemos descrito anteriormente para la sangre sin tratar con polvo de hierro. En este caso, la interfase celular está compuesta casi en su totalidad por linfocitos, aunque la eliminación de células adherentes no es total ya que suele permanecer un 2-3% de células que se tiñen específicamente con es terasa.

II.6. MARCADORES DE SUPERFICIE DE LAS DISTINTAS POBLACIONES LINFOCITARIAS.

II.6.1. Detección de células con receptores para el hematie de carnero.

En 1972, Jondal et al. (211) describieron la capacidad que tienen los linfocitos humanos de formar rosetas (rodearse de hematies) de una manera espontánea con hematies de carnero (E). Como hemos indicado en la Introducción esta propiedad la presentan los linfocitos T humanos.

Nosotros hemos empleado la unión directa, sin ningún ti-

po de tratamiento, de los linfocitos con los hematíes E, usando una concentración de 20-30% de suero bovino fetal (FCS) y una proporción final de 50:1. Ambas poblaciones celulares se centrifugan y se mantienen sedimentadas durante toda la noche a 4°C. A continuación, se resuspenden con mucho cuidado y se calcula el número de rosetas por conteo de al menos 200 linfocitos. Se consideraron rosetas linfocitos rodeados de tres o más hematíes. La lectura se realizó en un microscopio de fluorescencia después de añadir unas gotas de naranja de acridina a la suspensión celular.

De este modo se forman tanto las rosetas de alta como de baja afinidad.

II.6.2. Detección de células con inmunoglobulinas de superficie.

Para la identificación de células con inmunoglobulinas de superficie, $1-2 \times 10^6$ células, previamente sedimentadas y resuspendidas, se incubaron con 0.1 ml de un suero de cabra fluorescente anti-inmunoglobulinas humanas, a la dilución adecuada de acuerdo con una previa titulación. La mezcla se incubó durante 45 min. a 4°C. Después de la incubación, las células se lavaron tres veces con medio, se resuspendieron en una gota de glicerina al 50% en tampón fosfato salino 0.15M pH 7.4 (PBS) y se contaron, con objetivo de inmersión, en un microscopio de fluorescencia Leitz, equipado con epifluorescencia y lámpara de mercurio HB 200.

II.6.3. Detección de las células con receptores para el fragmento Fc de la IgG.

El número de células con este receptor se valora contabilizando las células capaces de formar rosetas con hematies de buey sensibilizados con IgG de conejo anti-buey (EA). Para formar estas rosetas nosotros hemos empleado el procedimiento descrito por Moreta et al. (67): una suspensión al 50% de hematies de buey frescos se mezcla con un volumen igual de una dilución de IgG, anti-hematies de buey, previamente titulada para que no exista aglutinación de los hematies. A continuación, se incubó esta mezcla a 30°C durante 30 min. y los hematies sensibilizados se lavaron 3 veces con medio a 450 g durante 5 min., y se resuspendieron a una concentración final de 1% (200×10^6 cel./ml). Se añadieron 0,25 ml de esta disolución de hematies sensibilizados por 1×10^6 linfocitos, se centrifugó la mezcla a 400 g durante 5 min. y se incubó a 37°C durante 30 min. El sedimento celular se resuspendió cuidadosamente y se contó el número de rosetas en un microscopio de fluorescencia, después de añadir una gota de naranja de acridina.

II.6.4. Detección de las células con receptores para complemento.

Los hematies de buey se incubaron con un volumen igual de IgM anti-hematies de buey, durante 30 min. a 37°C. Después se lavaron 3 veces, se resuspendieron y se incubaron con el mismo volumen de SHN fresco diluido, manteniéndose la mezcla a 37°C durante 30 min.

Una vez lavadas tres veces con medio, se resuspendieron al 1% en PBS (EAC). 0.25 ml de EAC se mezclaron con 1×10^6 células, se centrifugaron a 400 g durante 10 min. y se incubaron a 37°C durante 30 min. Una vez resuspendidas se contaron como se indica en el párrafo anterior.

II.6.5. Detección de monocitos y macrófagos por la tinción de esterasas inespecíficas.

La identificación de monocitos y macrófagos se puede realizar por técnicas histoquímicas gracias al alto contenido en enzimas lisosómicos de estas células. Nosotros hemos empleado el método descrito por Koski et al. (101). Para ello, se realizan extensiones de la suspensión celular cuyo contenido en macrófagos se quiere determinar (conviene que las células estén en presencia de suero para obtener una mejor morfología). Las extensiones se fijan durante 30 min. sumergiéndolas en líquido fijador, tras lo cual se lavan cuatro veces en agua destilada y se secan al aire durante 30 min. A continuación, se sumergen en una solución formada por 45 ml de tampón fosfato M/15 de Sorensen, 0.25 ml de para-rosanilina hexazohizada v/v con nitrato sódico al 4% y 3 ml de una solución de α -nactilbutirato, y se ponen en un baño a 37°C durante 45 min.; nuevamente se lavan cuidadosamente con agua destilada y se tiñen con una solución al 0.5% de verde de metilo como solución contraste. Finalmente, se secan al aire durante 30 min. y se miran al microscopio. Las células que contienen esterasas se distinguen fácilmente por la presencia de múltiples granu

los rojos en el citoplasma, lo que contrasta con el color verde de las células esterasas negativas.

II.7.. SEPARACIÓN DE LINFOCITOS EN SUS DIFERENTES POBLACIONES.

II.7.1. Obtención de linfocitos T por columnas de nylon.

Para obtener linfocitos T, tanto a partir de sangre periférica como de amígdalas, se siguió el método descrito por Papamichail et al. (212). Seiscientos mg de fibra de nylon se trataron con una solución de ClH 0.2N, se lavaron varias veces con agua destilada y a continuación con Hank's hasta recuperar un pH neutro. Luego, se introdujeron en una columna de 5 ml y la columna obtenida se lavó con Hank's suplementado con 10% de FCS y se incubó a 37°C durante 30 min. Posteriormente se añadieron 30-40 millones de linfocitos suspendidos en Hank's en presencia de 10% de FCS, incubándose de nuevo a 37°C durante 30 min. Las células no adheridas al nylon se eluyeron con 10 ml de Hank's y se lavaron 2 veces. La recuperación celular en el caso de la sangre periférica fue aproximadamente de un 50%. La población eluida contenía menos de 1% de células con inmunoglobulinas de superficie.

II.7.2. Obtención de linfocitos T y no T por roseteo con hematies de carnero.

Se siguió una modificación del método de Dean et al. (213). Linfocitos provenientes bien de sangre periférica o de amígdalas,

se mezclaron con hematies de carnero frescos en una proporción de 100:1, en presencia de 20-30% de FCS. Para obtener esta relación se añadieron 0.25 ml de hematies diluidos al 2% por cada millón de linfocitos. La mezcla se centrifugó a 400g durante 5 min. y se incubó toda la noche a 42C. Después de una suave resuspensión del sedimento, y una vez contado el número de rosetas, las células se separaron en un gradiente de Ficoll-metrioato sódico, que se centrifugó a 400 g durante 30 min. Las células que forman rosetas se quedan en el sedimento (E-RFC), mientras que en la interfase quedan los linfocitos que no tienen receptores para hematies de carnero (linfocitos no T). Tanto la interfase como el sedimento se recogieron y se resuspendieron en medio, contándose el número de rosetas en ambas poblaciones. Para obtener un mayor enriquecimiento, cada fracción se trató de nuevo con eritrocitos de carnero siguiendo los pasos descritos anteriormente. Con este procedimiento se obtuvieron dos poblaciones, una con 91-95% de E-RFC (linfocitos T), y otra con menos del 2% de E-RFC (linfocitos no T). Los hematies que formaban las rosetas se eliminaron por lisis, mediante un choque hipotónico con NH_4Cl 0.83% en Tris 10mM pH 8.6 durante 5 min. a temperatura ambiente. Las células de ambas poblaciones se lavaron tres veces con medio y se resuspendieron a la concentración adecuada.

II.7.3. Obtención de linfocitos B, a partir de la población no T, por eliminación de las células nulas.

Linfocitos no T de amígdalas, obtenidos como se describe en

el párrafo anterior, se mezclaron con hematíes de buey sensibilizados con IgG de conejo anti-hematíes de buey en una proporción de 50:1. La mezcla se centrifugó a 400 g durante 5 min. y se incubó a 37°C durante 30 min. Después de este tiempo, se agitó cuidadosamente y se resuspendió para formar un gradiente de Ficoll-metrioato sódico en las mismas condiciones descritas anteriormente. Dicho gradiente se centrifugó a 450 g durante 30 min. A continuación, se recogió la interfase y se contó el número de rosetas, dando en todos los casos valores inferiores al 2%. Las células se lavaron varias veces y se resuspendieron a la concentración deseada. Esta población está formada por linfocitos B Fc⁻, con un 95% de inmunoglobulinas de superficie.

II.7.4. Fraccionamiento de linfoblastos, obtenidos en un cultivo mixto de linfocitos, en función de su densidad por un gradiente discontinuo de Percoll.

Linfoblastos humanos obtenidos en un cultivo mixto de linfocitos de sangre periférica, como describimos posteriormente, se separaron en varias fracciones por centrifugación en un gradiente discontinuo de Percoll, según el método descrito por Kurnit et al. (214).

Para formar este gradiente se parte de una solución base formada por 9 partes de Percoll y una parte de una disolución de PBS 1.5M pH 7.4 (Percoll 100%), a partir de la cual, se forman disoluciones al 60%, al 50%, al 40%, al 30% y al 20%. 10-20x10⁶ de las células en PBS/BSA se centrifugaron a 250g durante 10 min., y

sobre el sedimento resuspendido en 0.5 ml. de Percoll al 10%, se fueron añadiendo cuidadosamente 0.5 ml de Percoll al 60%, 1 ml al 50%, 2 ml al 40%, 1 ml al 30% y 0.5 ml al 20% formándose un gradiente discontinuo como se puede ver en la figura 11, que se centrifugó a 1500 g durante 10 min. Las células se repartieron en diferentes bandas, que se recogieron cuidadosamente con una pipeta Pasteur, se lavaron dos veces con medio y se resuspendieron a la concentración adecuada para estudiar síntesis de DNA, marcadores de superficie y activación de complemento.

II.8 OBTENCION DE IL-2

La interleuquina 2 (IL-2) se obtuvo mediante el método descrito por Alvarez et al. (215) con algunas modificaciones: células procedentes de amígdalas a una concentración de 5×10^6 /ml en RPMI completo suplementado con 10% de FCS, se incubaron durante 24 horas en presencia de 1% de PHA. Con el fin de eliminar éste mitógeno y lograr un cierto grado de purificación, los sobrenadantes de estos cultivos se sometieron a una precipitación fraccionada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 40 y 80%. El precipitado se resuspendió en 100 ml de PBS, se dializó frente a 5 l. de PBS durante 48 horas y se concentró mediante diálisis a vacío frente a PBS.

La actividad IL-2 de estas muestras se midió por la capacidad de respuesta de células T mantenidas en cultivo prolongado (CTC) al menos durante 10 días, según el método descrito por Gillis et al. (216). Para ello las CTC una vez lavadas, se

69 h

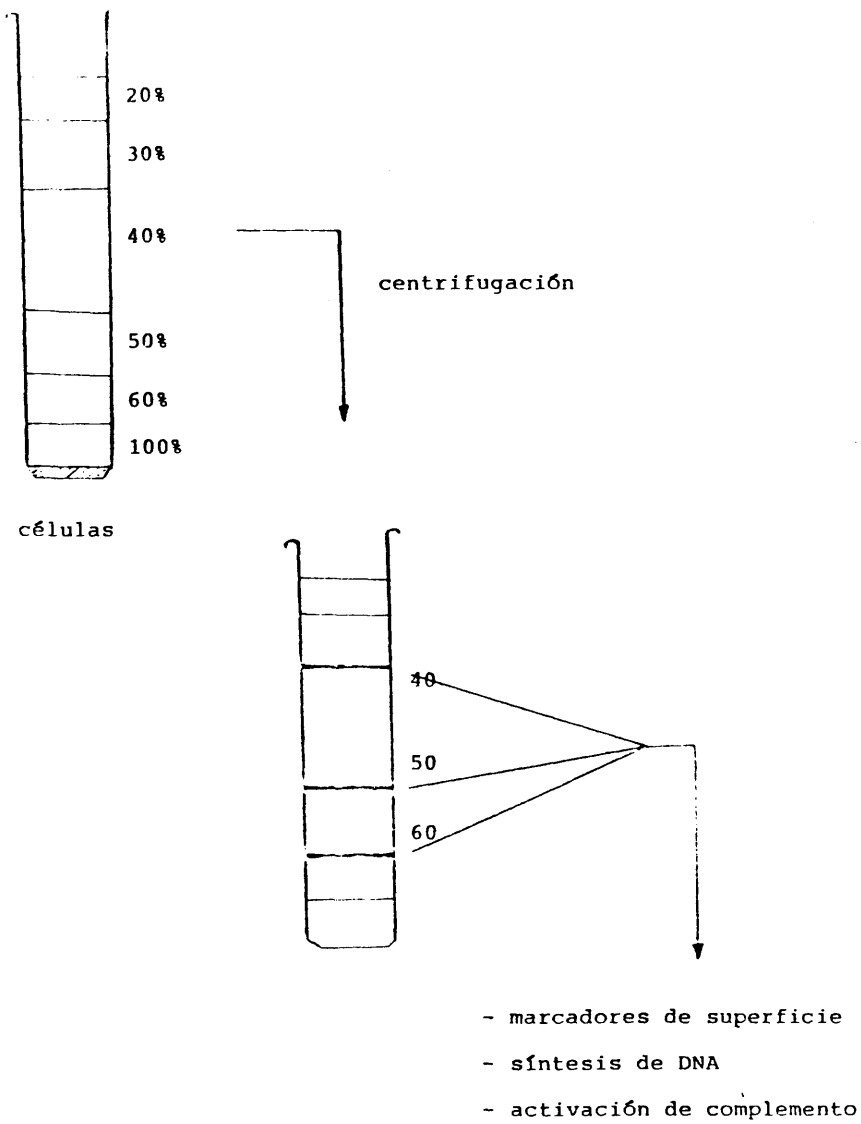


Figura 11. FRACCIONAMIENTO DE LINFOBLASTOS MEDIANTE UN GRADIENTE DISCONTINUO DE PERCOLL.

resuspendieron en RPMI completo suplementado con 40% de suero AB humano inactivado por calor y se ajustaron a una concentración de 2×10^5 /ml. 0.1 ml de diluciones seriadas de las muestras se añadieron a un volumen igual de CTC por triplicado, en placas de microtitulación. Las mezclas se incubaron en estufa de CO_2 , midiéndose la síntesis de DNA mediante la incorporación de timidina- H^3 a las 48 horas de cultivo. La actividad de los diferentes sobrenadantes calculada en cpm se expresó en % referido a una máxima actividad (100%) que correspondía a una determinada dilución de un sobrenadante control. Se definió una unidad de actividad de IL-2 como la dilución que producía un 50% de la actividad del control.

II.9. CULTIVO DE LINFOCITOS

II.9.1. En presencia de mitógenos

II.9.1.1. PHA

Linfocitos totales o linfocitos T de sangre periférica a una concentración de 1.5×10^6 cel./ml en RPMI completo suplementado con 10% de suero AB humano inactivado por calor y PHA a una concentración del 1%, se cultivaron en frascos de plástico de 50 ml a 37°C y CO_2 al 5%. Paralelamente, se incubaron linfocitos en las mismas condiciones en ausencia de mitógeno. A diferentes tiempos de incubación, las células se lavaron 3 veces con medio y se estudió su capacidad de activar complemento

como se describe a continuación. Simultáneamente, 0.2 ml de la suspensión celular se cultivaron por triplicado en placas de microtitulación de fondo plano para medir la síntesis de DNA. Al final de la incubación se les añadió 2 μ Ci de timidina- H^3 . Después de 24 horas los cultivos se filtraron y la radioactividad se midió usando un contador de centelleo estandar.

II.9.1.2 PWM

Linfocitos no T de amígdalas resuspendidos en RPMI completo con 10% de FCS se pusieron en placas de microcultivo de fondo plano junto con linfocitos T autólogos resuspendidos en el mismo medio.

Estos dos tipos de células se mezclaron según las siguientes relaciones:

- T/B = 1/1. Para ello se añadieron a cada pocillo de la placa 0.1 ml de células T a una concentración de 0.5×10^6 cel./ml y 0.1 ml de linfocitos no T a una concentración de 0.5×10^6 cel./ml.

- T/B = 5/1. Para obtener esta relación se mezclaron en cada pocillo 0.1 ml de linfocitos T a una concentración de 2.5×10^6 cel./ml y 0.1 ml de linfocitos no T a una concentración de 0.5×10^6 cel./ml.

Como podemos observar en ambos casos se mantuvo constante el número de células no T: 0.05×10^6 /pocillo.

En todos los casos se hicieron triplicados en ausencia y presencia de PWM a una concentración final del 1% y se realiza-

ron controles con células totales de amígdalas.

A días 5 y 7 del cultivo, se añadieron a cada pocillo 0.04ml de timidina- H^3 (50 μ c/ml), estudiándose su incorporación al cabo de 24 horas con la técnica habitual.

Para estudiar la secreción de inmunoglobulinas al medio, después de 10 días en cultivo, las placas se centrifugaron a 300 g durante 5 min. y se recogieron los sobrenadantes donde se testó la concentración de IgG e IgM por la técnica de ELISA ("enzyme linked immunosorbent assay"), como se describe a continuación.

II.9.2. Cultivo mixto unidireccional de linfocitos

En el cultivo mixto de linfocitos es necesario tener dos poblaciones linfocitarias de diferentes individuos de las cuales una ha sido previamente inhibida metabólicamente y se denomina estimuladora y la otra actúa como respondedora.

Las células estimuladoras se ajustaron a una concentración de 5×10^6 cel./ml en Hank's, se trataron con 50 μ gr/ml de mitomicina C durante 45 min. a 37°C, después se lavaron dos veces y se resuspendieron en RPMI completo con 10% de suero AB humano inactivado por calor, a una concentración final de 1.5×10^6 cel./ml, se mezclaron con células respondedoras resuspendidas en el mismo medio y a la misma concentración, y se cultivaron en estufa de CO₂. Los cultivos se realizaron en placas de microtitulación de fondo plano y en frascos de 50 ml. Para ello, se pusie-

ron 0.1 ml en cada pocillo de la placa y 5 ml en cada frasco de cada una de las suspensiones celulares. Como controles se cultivaron células estimuladoras y respondedoras por separado.

Después de 6 días en cultivo, las células de los frascos se recogieron, se lavaron dos veces y se sometieron a un gradiente discontinuo de Percoll para separar las células que habían respondido al estímulo alogénico de las que no lo habían hecho. En las diferentes fracciones recogidas se estudiaron marcadores de superficie, activación de complemento y síntesis de DNA.

En paralelo se estudió la síntesis de DNA mediante la incorporación de timidina- H^3 .

II.9.3. Cultivo prolongado de linfoblastos en presencia de IL-2.

La IL-2 obtenida como se describe anteriormente, se utilizó para mantener linfoblastos en cultivo prolongado. Los linfoblastos obtenidos por incubación con PHA durante dos ó tres días, se lavaron tres veces y ajustados a una concentración de 0.3×10^6 cel./ml en RPMI 1640 completo suplementado con 10% de suero AB humano inactivado por calor y en presencia del 15% de IL-2, se incubaron en placas de microtitulación de fondo plano (0.2 ml/pocillo), por triplicado, para estudiar la síntesis de DNA, y en frascos de plástico de 25 ml (10 ml/frasco), para estudiar la activación de complemento. Ambos parámetros se midieron en días sucesivos de cultivo. Se hicieron controles en ausencia de IL-2.

II.10. DETECCIÓN DE INMUNOGLOBULINAS EN SOBRENADANTES DE CULTI-
VOS POR LA TÉCNICA ELISA.

Esta técnica se utilizó para determinar la cantidad de inmu-
noglobulinas que existía en los sobrenadantes de cultivos de
linfocitos de amígdalas en presencia de PWM. Estos sobrenadantes
se recogieron a día 10 de cultivo.

El procedimiento se puede observar en la figura 12, y con-
siste en lo siguiente:

- Se añadieron a cada pocillo de una placa de polivinilo
0.2 ml de suero de cabra anti-IgG ó anti-IgM humanas, diluido
en tampón carbonato 0.05M a la concentración adecuada de acuer-
do con una previa titulación.
- Las placas se incubaron a 4°C durante 18 horas, lavándose
posteriormente tres veces con tween al 0.05% en PBS, con el fin
de eliminar las proteínas que no se habían adsorbido.
- Se añadieron 0.2ml/pocillo de diluciones seriadas de IgG
ó IgM estandar en PBS-tween al 0.05%, por duplicado, con el fin
de obtener curvas patrón. Se añadió IgG ó IgM según que la pla-
ca hubiese sido primeramente incubada con anti-IgG ó anti-IgM.
Las concentraciones de IgG variaron entre 164 ng/ml y 2.56ng/ml
y las de IgM desde 101 ng/ml hasta 3.15 ng/ml. A continuación.
0.2 ml/pocillo de los diversos sobrenadantes donde se quería de-
terminar la cantidad de IgG ó IgM, diluidos al 1:10, 1:100 y
1:500 en PBS-tween al 0.05 % por duplicado.

- Las placas se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con PBS-tween al 0.05 %.

- Se añadieron 0.2 ml/pocillo de un suero de cabra anti-IgG ó anti-IgM humanas marcadas con peroxidasa, diluido de acuerdo con una previa titulación en PBS-tween al 0.05 %.

- Las placas se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con PBS-tween al 0.05 % y sobre cada pocillo se añadieron 0.2 ml de una disolución de OPD (orto fenilendiamino) a una concentración de 10 mg/ml en metanol, diluida 1:25 en tampón fosfato 0.1M añadiéndose H_2O_2 a una concentración final del 0.17 % (de una solución comercial al 10 %), preparada en el momento de utilizarla.

- Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante una hora y después se añadieron 0.05 ml/pocillo de H_2SO_4 4N, con el fin de parar la reacción enzimática.

- Las placas se leyeron en un colorímetro con un filtro de 492 nm, obteniéndose una densidad óptica para cada pocillo.

Representando gráficamente la densidad óptica frente a las diferentes concentraciones de la IgG ó IgM estandar, se obtiene una línea recta que se usa como curva patrón para obtener las concentraciones de IgG ó IgM de los sobrenadantes.

II.11. ACTIVACIÓN DE COMPLEMENTO POR CÉLULAS.

II.11.1 Incubación de las células con diferentes fuentes de complemento.

75/611

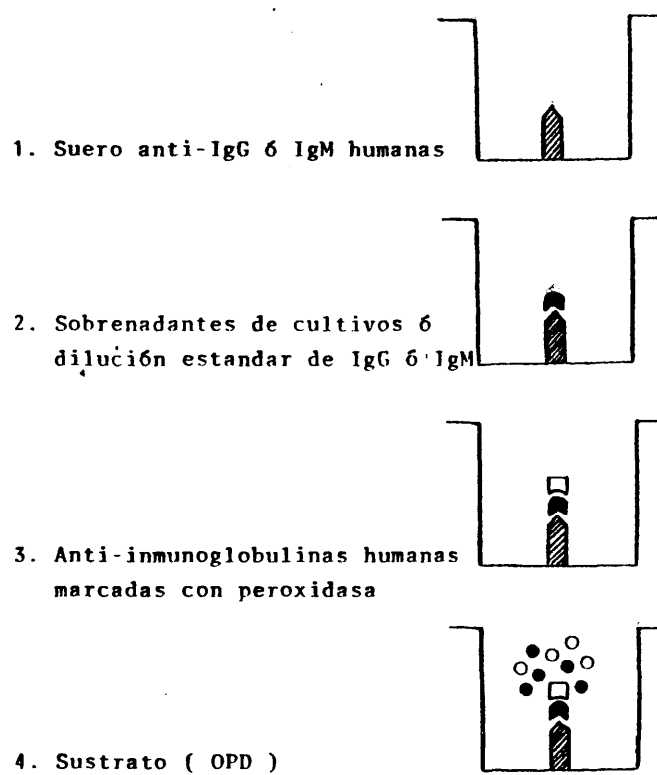


Figura 12. DETECCION DE INMUNOGLOBULINAS HUMANAS EN SOBRENADANTES DE CULTIVOS POR LA TECNICA ELISA.

En los experimentos de sangre periférica se empleó como fuente de complemento suero autólogo, y en los de amígdalas SHN, que se absorbió durante al menos una hora a 4°C con las células en las que posteriormente se iba a estudiar la activación de complemento. El suero empleado como fuente de complemento se usaba fresco, o se mantenía en alícuotas congeladas a -70°C ó en nitrógeno líquido, empleando cada alícuota una sola vez.

Para saber que vía estaba implicada en la activación de complemento por células en SHN se trató con EDTA 0.1M en PBS y con EGTA 0.1M y Cl_2Mg 35mM en PBS. El suero con EDTA se preparó diluyendo 10 veces el EDTA 0.1M en dicho suero, y el suero tratado con EGTA y Cl_2Mg se preparó diluyendo 10 veces el EGTA 0.1M y 20 veces el Cl_2Mg 35mM en el suero.

Posteriormente, 2 ó 3 millones de células se incubaron con 0.1 ml de SHN sin tratar o tratado como se ha indicado anteriormente, se centrifugaron a 400 g durante 10 min. y los sobrenadantes se recogieron para realizar electroforesis bidimensional cruzada y medir su capacidad hemolítica. Las células se lavaron dos veces y se tiñeron con un suero fluoresceinado de cabra anti-C3 humano.

II.11.2. Tinción con un suero fluoresceinado de cabra anti-C3 humano.

Los fragmentos de C3 depositados sobre las membranas citoplasmáticas, después de la incubación de las células con SHN, se

visualizaron por tinción con un suero fluoresceinado de cabra anti-C3 humano, previamente titulado. Las células, una vez lavadas, se incubaron con 0.1 ml de dicho antisuero durante 30 min. a 4°C.

Después de lavar las células tres veces, se añadió sobre ellas una gota de glicerol al 50% en PBS y se contaron en un microscopio de fluorescencia Leitz equipado con epifluorescencia, empleando una lámpara de mercurio 200HBO y un filtro de excitación KP490. En cada experimento, se contaron al menos 200 células.

En todos los experimentos se realizaron controles de células incubadas con medio en lugar de SHN, para visualizar posible C3 existente en la membrana previamente a la incubación con suero. Estos controles fueron siempre negativos.

II.11.3. Electroforesis bidimensional cruzada.

La activación de complemento por membranas citoplasmáticas también se detectó determinando los productos de activación de C3 por electroforesis bidimensional cruzada, que se realizó con los sobrenadantes de la incubación de SHN con células, y con suero incubado a 37°C y a 4°C como controles, ya que la simple incubación del suero a 37°C puede producir una pequeña activación de complemento.

Se colocaron 10 ml de agarosa al 1% en tampón barbital 0.02M pH 8,6, conteniendo EDTA 0.01M, en placas de 10x10 cm. Estas

placas se troquelaron con 9 agujeros de 2 mm de diametro, como se indica en la figura 13. En estos agujeros se colocaron 3 μ l de las diferentes muestras a estudiar y las placas se sometieron a una corriente de 23 mA/placa durante una hora en un aparato de electroforesis refrigerado. La electroforesis se realizó en tampón barbital.

A continuación se eliminó la agarosa dejando 3 filas donde habían corrido las proteínas del suero en virtud de la corriente eléctrica aplicada (Fig. 13), y se añadieron sobre la placa 11 ml de nueva agarosa al 1% que contenía 0.2 ml de un suero de cabra anti-C3 humano. Se aplicó una corriente de 18 mA/placa durante 4 horas y las proteínas del suero corrieron en la segunda dimensión según indica la figura 13.

Las placas se secaron durante 30 min., se lavaron dos veces con suero salino en períodos de 15 min., se dejaron secar durante 30 min. y se lavaron nuevamente dos veces con agua destilada en períodos de 15 min. Se dejaron secar en una estufa a 60°C durante toda la noche. Una vez secas, se tñieron durante 5 min. con una solución que contenía 50 g de azul brillante Coomassie, 4.5 l. de etanol 96%, 1.0 l. de ácido acético glacial, y se destñeron varias veces con una solución que contenía 4,5 l. de agua destilada, 4.5 l. de etanol al 96% y 1.0 l. de ácido acético glacial.

Se obtuvo un pico de precipitación cuando el complemento no había sufrido activación, que correspondía a C3 nativo, y dos picos de precipitación cuando había activación de complemento que correspondían a C3 nativo y a productos de la activación de C3.

78611

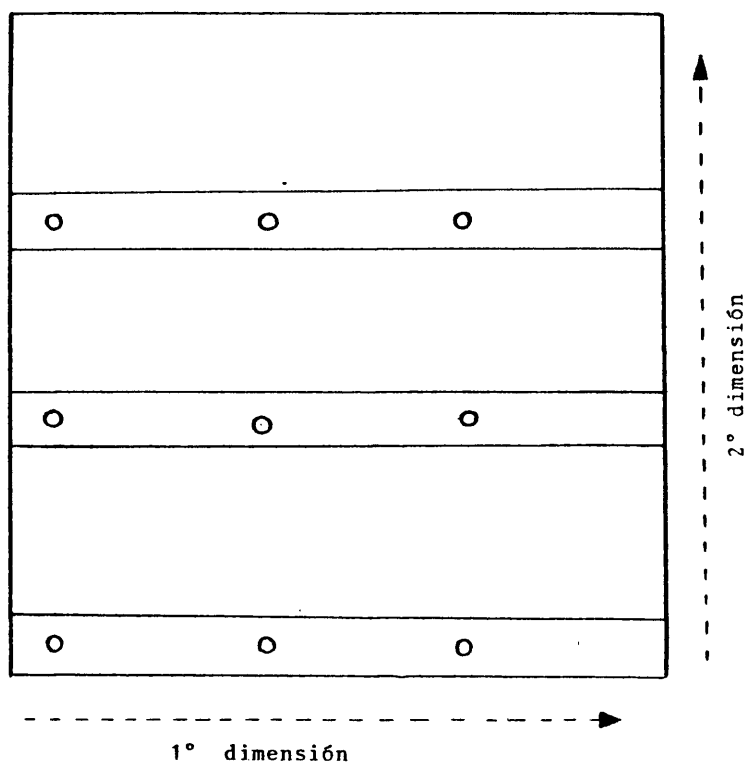


Figura 13. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL CRUZADA.

11.11.4. Medida de la actividad hemolítica.

Este método se basa en la capacidad lítica del complemento sobre hematíes de carnero previamente sensibilizados. La lisis produce liberación al medio de hemoglobina, cuya concentración es determinada espectrofotométricamente a 413 nm.

La unidad de medida de esta técnica es CH_{50} que se define como aquella dilución del suero que es capaz de lisis al 50% de los hematíes puestos en el ensayo.

Una suspensión al 5% de hematíes de carnero se incubaron a 37°C 30 min. con suero de conejo anti-hematíes de carnero en volúmenes iguales. El suero de conejo había sido previamente titulado con la finalidad de saber la máxima concentración que no producía aglutinación de los hematíes.

Después de la sensibilización, los hematíes se diluyeron en tampón barbitol 0.15M pH 7.4 conteniendo Cl_2Mg 1.0M y Cl_2Ca 0.3M (CFD "complement fixation diluent") a una concentración final de 200×10^6 cel./ml. 0.2 ml de esta suspensión celular se añadieron a 0.3 ml de diferentes diluciones de los sobrenadantes. La suelta espontánea se obtuvo añadiendo a 0.2 ml de la suspensión de hematíes sensibilizados 0.3 ml del tampón CFD y la suelta total añadiendo 0.3 ml de agua.

Estas mezclas se incubaron durante una hora a 37°C, y a continuación se añadieron 1.5 ml de suero salino a cada tubo. A continuación se centrifugaron a 400 g durante 5 min. y se recogieron los sobrenadantes donde se leyó la hemoglobina liberada,

por espectrofotometría a 413 nm. De este modo, se obtuvieron los valores de absorción para las diferentes diluciones de los sobrenadantes en cuestión. Estos valores se corrigieron restando el valor de la suelta espontánea y se expresaron en % respecto a la lisis total, a los datos así obtenidos se les denomina "y" en la ecuación de Von Krogh:

$$x = k (y/100-y)^{1/n} \quad \text{siendo} \quad \begin{array}{l} x - \text{volumen de suero añadido} \\ y - \% \text{ de lisis} \\ k - CH_{50} \end{array}$$

La pendiente de la recta obtenida representando x frente a y/100-y en papel logarítmico nos da el valor de CH_{50} .

II.12. TRATAMIENTO CON NEURAMINIDASA.

La neuraminidasa es una enzima que elimina el ácido siálico de las glicoproteínas. Dos millones de células se resuspendieron en 1 ml de Hank's que contenía diferentes unidades de neuraminidasa de *Vibrio Cholerae*, y se incubaron durante 30 min. a 37°C. Se lavaron tres veces, se comprobó viabilidad y se estudió la capacidad para activar complemento como se ha descrito en el párrafo anterior.

II.13. ELECTROFORESIS CELULAR

II.13.1. Electroforesis celular analítica.

La electroforesis celular se llevó a cabo según el método

descrito por Brown et al. (217). Los electrodos y las cámaras de los capilares estuvieron a una temperatura constante de 25°C y contenían medio 199 pH = 7,4. Una corriente de polarización de 60 voltios producía una intensidad de corriente de 4 mA en el capilar y una intensidad de campo de 8,6 V/cm. Todas las medidas electroforéticas se realizaron en muestras que contenían 1×10^6 cel./ml.

La movilidad electroforética de cada célula se expresó en unidades definidas en términos de velocidad ($\mu\text{m/s}$) e intensidad de campo (V/cm). Se calculó como el tiempo invertido por una célula en recorrer una distancia de 25 μm en direcciones opuestas, después de invertir la polaridad. De cada suspensión de linfocitos se estudiaron 170-200 células y sus movilidades electroforéticas (M.E.) se expresaron $\mu\text{m. cm. s}^{-1} \text{ V}^{-1}$. Para el cálculo de los valores medios, se aceptaron como válidos los pares de valores de tiempo, obtenidos antes y después de invertir la polaridad, que variaban en menos de un 5%.

De este modo, fué posible obtener las movilidades electroforéticas de las células de diferentes poblaciones linfocitarias, y por tanto, la distribución de las células de cada población según sus movilidades electroforéticas.

Antes de cada estudio de linfocitos se ajustó el aparato según el movimiento electroforético de eritrocitos de un donante sano cuya movilidad electroforética era conocida, ya que este parámetro permanece constante en los eritrocitos durante varios meses.

II.13.2. Electroforesis celular preparativa.

El fundamento es análogo a la electroforesis celular analítica.

El flujo de entrada fué 1,7-3 ml/h de una suspensión celular que contenía 20×10^6 cel./ml. Se recogieron fracciones de células con distinta movilidad electroforética; se lavaron, se contaron y en cada una de ellas se estudió la capacidad de activar complemento como se describe anteriormente.

II.14. SEPARACIÓN DE POBLACIONES CELULARES CON EL FACS.

Mediante el FACS ("fluorescence activated cell sorter") se pueden separar poblaciones celulares heterogéneas en virtud de la cantidad de moléculas de fluoresceína que están unidas a su membrana y del tamaño celular. El funcionamiento del FACS que se puede observar en la figura 14 consiste en lo siguiente:

A partir de la suspensión celular se origina, gracias a un vibrador ultrasónico, una corriente de sección muy pequeña que es iluminada por un rayo láser, que excita las moléculas de fluoresceína, recogándose la luz fluorescente producida en un tubo fotomultiplicador, el que genera una señal eléctrica proporcional al número de moléculas de fluoresceína que hay sobre cada célula. También se genera una segunda señal, relacionada con el volumen de la célula, por detección de la difracción que la luz sufre al incidir sobre dicha célula.

Ambas señales se convierten en pulsos electrónicos que sirven para cargar el flujo celular exactamente cuando la gota que contiene la célula en estudio se está formando. Una vez cargadas son sometidas a un campo eléctrico desviándose hacia el ánodo o el cátodo, de acuerdo con su carga. Las gotas no cargadas continúan su curso sin desviarse. De esta manera es posible obtener poblaciones celulares separadas en función de la tinción fluorescente en su membrana.

El FACS puede operar eficientemente en rangos próximos a 5000 células/s, con una pureza de un 90-95% y una viabilidad del 100%.

Nosotros hemos utilizado el FACS para separar las poblaciones activadoras de complemento y no activadoras de complemento, tanto en el caso de linfocitos no T de amígdalas como de linfoblastos obtenidos por estimulación con PHA de linfocitos de sangre periférica. Las células se incubaron con SHN y a continuación con el suero de cabra fluoresceinado anti-C3 humano; se suspendieron en medio suplementado con 10% de FCS y se separaron mediante el FACS en células activadoras de complemento (CAC +) y no activadoras (CAC -). Una vez lavadas se visualizaron con el microscopio de fluorescencia para controlar la eficacia de la separación. Con linfocitos B de amígdalas se obtuvieron poblaciones 100% puras, mientras que la pureza obtenida en los linfoblastos T fué del 92%.

Ambas poblaciones se resuspendieron en RPMI en presencia de 10% de FCS y se incubaron toda la noche a 37°C con el fin de que

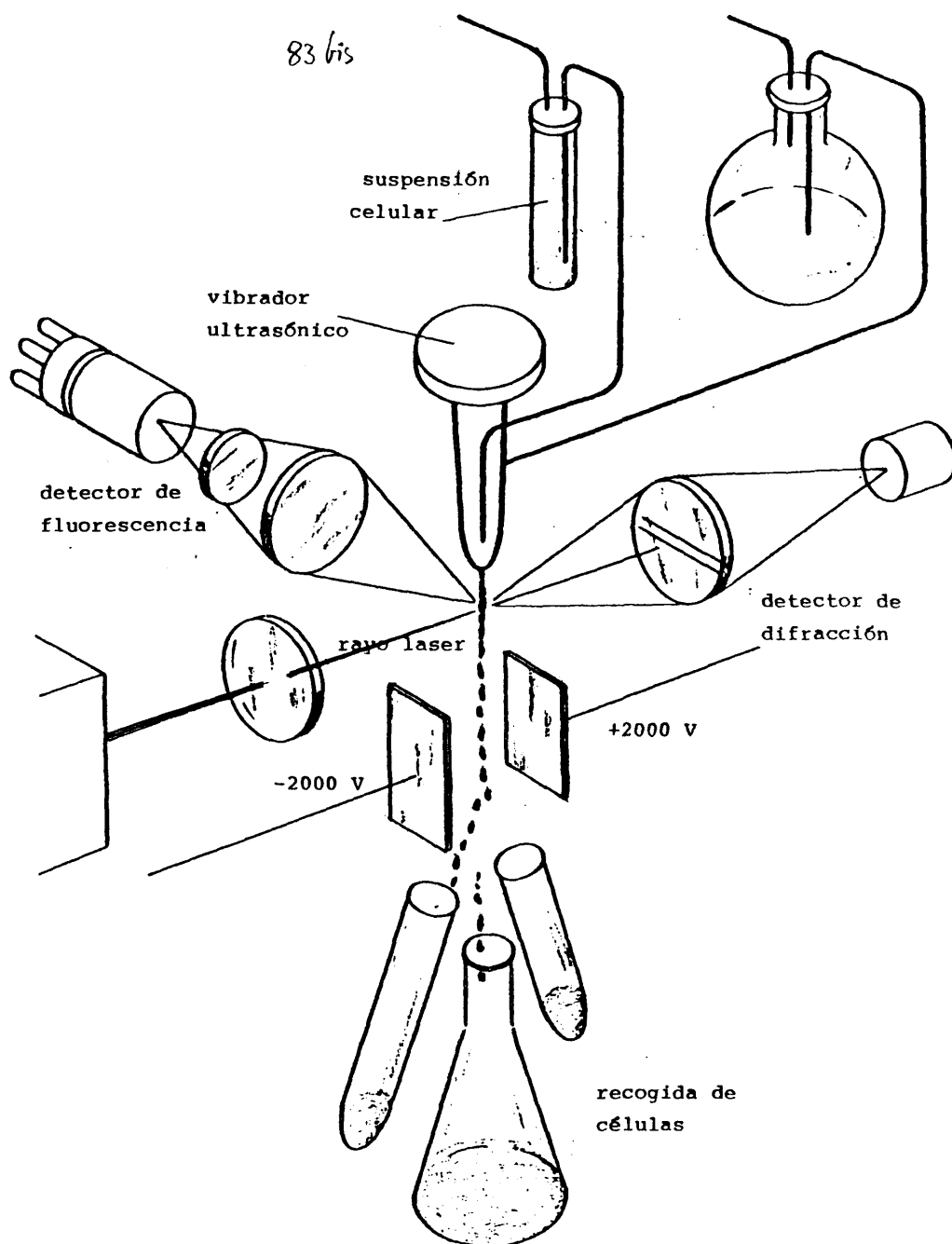


Figura 14. ESQUEMA DE FUNCIONAMIENTO DEL FACS.

eliminaran los complejos C3-anti-C3-FITC de su membrana.

Las poblaciones separadas de linfocitos B se cultivaron con PWM y las de los linfoblastos T con IL-2, como se ha indicado anteriormente.

RESULTADOS

III.1. ACTIVACIÓN DE COMPLEMENTO POR LINFOCITOS. CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN LINFOCITARIA QUE ACTIVA COMPLEMENTO.

III.1.1. Activación de complemento por linfocitos de sangre periférica.

Linfocitos procedentes de sangre periférica incubados con SHN autólogo como fuente de complemento, presentan C3 unido a su membrana, ya que se tiñen con un suero anti-C3 humano fluoresceinado.

Este fenómeno podría deberse a un depósito pasivo del C3 existente en el suero sobre la membrana celular, aunque se ha descrito que el C3 nativo no se puede unir a la membrana celular, y en nuestro caso se demuestra porque si este fenómeno se debiese a un depósito pasivo del C3 existente sin conllevar una acción activa de la membrana ni de las proteínas del sistema del complemento, el fenómeno sería independiente de la temperatura a la que se incuban las células con el suero y del tratamiento previo de este con EDTA, que quela Ca^{2+} y Mg^{2+} , impidiendo la activación de complemento, tanto por la vía clásica como por la vía alternativa. Pero como puede observarse en la tabla 6, el porcentaje de células teñidas desciende hasta 0-1% cuando la incubación se realiza a 4°C ó cuando el suero ha sido previamente tratado con EDTA ó calentado a 56°C durante

TABLA 6

ACTIVACIÓN DE COMPLEMENTO POR LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA

FUENTE DE COMPLEMENTO	TRATAMIENTO	TEMPERATURA DE INCUBACIÓN (°C)	CAC (%) #
SHN autólogo	ninguno	37	7.2 ± 4.0
SHN autólogo	ninguno	4	1.0 ± 0.5
SHN autólogo	56°, 30 min.	37	1.1 ± 0.3
SHN autólogo	EDTA 0.01M	37	0.8 ± 0.2

85 613

CAC - Células activadoras de complemento, teñidas con anti-C3 humano fluoresceinado, después de la incubación con SHN autólogo.

30 min.; indicándonos que el hecho observado es debido a la generación de C3b y depósito de este fragmento sobre la membrana celular, es decir, a un proceso activo de activación del sistema del complemento por la membrana celular (218).

Este hecho fué corroborado con los datos de la electroforesis bidimensional del SHN incubado a 37°C en presencia y en ausencia de linfocitos. En la figura 15 puede observarse que en el SHN incubado con linfocitos se genera C3b (proteína que corre en la región β -globulina y es más rápida que el C3 nativo) a costa del C3 nativo, cuyo contenido en el suero disminuye. La incubación del SHN a 37°C genera una pequeña cantidad de C3b (dibujo inferior) pero que es mucho menor a la producida cuando el suero se incubaba en presencia de linfocitos.

III.1.2. Viabilidad de las células después de la incubación con SHN.

Era necesario comprobar si la incubación con SHN producía la lisis de las células con capacidad para activar el sistema del complemento. Para ello, se comprobó la viabilidad de las células después de dicha incubación y como puede observarse en la tabla 7, se encontró un 90% de células viables análogamente al caso de los controles.

Es decir, detectábamos la activación de complemento con depósito de los fragmentos de C3 sobre la membrana celular, sin llegar a la lisis de la célula activadora.

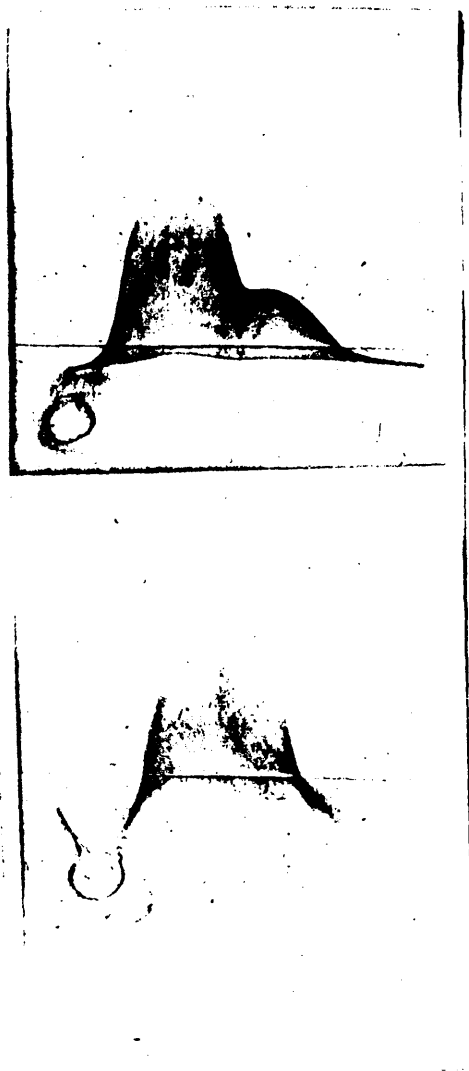


Figura 15.ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL CRUZADA DE SUERO
HUMANO NORMAL INCUBADO EN PRESENCIA Y AUSENCIA
DE CELULAS.

TABLA 7

VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS DESPUÉS DE LA INCUBACIÓN CON SHN

	FUENTE DE COMPLEMENTO	VIABILIDAD ** (%)
Experimento 1	SHN*	95
	SHN-EDTA	90
Experimento 2	SHN	85
	SHN-EDTA	80
Experimento 3	SHN	89
	SHN-EDTA	80

* Suero humano normal autólogo

** Porcentaje de células vivas por exclusión con azul tripan.

III.1.3.. Papel de los anticuerpos en la activación de complemento.

Para descartar que posibles anticuerpos específicos o inmunocomplejos presentes en el suero fueron responsables de la activación de complemento observada, empleamos como fuente de complemento suero autólogo, suero previamente absorbido a 4°C, ó suero de un paciente con agammaglobulinemia que contenía menos de 50 µg/ml de IgG, IgM ó IgA. En los tres casos, el porcentaje de células que activaban complemento era similar, sugiriéndonos que la activación de complemento no se iniciaba por anticuerpos ó complejos inmunes (Tabla 8).

III.1.4. Vía por la que se produce la activación de complemento por linfocitos.

La vía clásica es dependiente de Ca^{2+} y Mg^{2+} ; y la vía alternativa de Mg^{2+} . El tratamiento del SHN con EDTA ó EGTA y Cl_2Mg permite discriminar por que vía los linfocitos activan complemento.

En la tabla 9, observamos que la tinción fluorescente no desaparece con el tratamiento del suero con EGTA y Cl_2Mg , indicándonos que los linfocitos activan complemento por la vía alternativa.

Otra forma de comprobar a través de que vía se produce la activación de complemento es calentar el SHN a 52°C durante

TABLA 8

LA ACTIVACIÓN DE COMPLEMENTO ES INDEPENDIENTE DE ANTICUERPOS

FUENTE DE COMPLEMENTO	CAC (%)
SHN autólogo	10.0 \pm 6.2
SHN absorbido *	10.5 \pm 3.1
Suero de un paciente ** con agammaglobulinemia	7.5 \pm 4.0

* 0.1 ml de suero se absorbieron con 2×10^6 - 4×10^6 de linfocitos del propio donante, durante al menos 1 hora a 4°C.

** Este suero contenía menos de 50 μ g/ml de IgG, IgA e IgM.

TABLA 2

VIA IMPLICADA EN LA ACTIVACIÓN DE COMPLEMENTO POR LINFOCITOS
DE SANGRE PERIFÉRICA.

TRATAMIENTO DEL SHN AUTÓLOGO	CAC(%)
Ninguno	8.0 \pm 5.3
EDTA 0,01 M	0.7 \pm 0.3
EGTA 0,01 M + Cl_2Mg 0,7mM	3.0 \pm 2.0
56°C 30 minutos	1.1 \pm 0.2
52°C 20 minutos	0.8 \pm 0.1

20 minutos, previamente a la incubación con las células, ya que a esta temperatura se destruyen algunos factores termolábiles (factor B) necesarios para la activación por la vía alternativa. La desaparición de la fluorescencia cuando el SHN es previamente calentado a 52°C (Tabla 9) nos corrobora el hecho de que los linfocitos activan complemento por la vía al ternativa.

III.1.5. Activación de complemento por linfocitos de diferentes órganos linfoides.

La activación de complemento no es una propiedad de los linfocitos de sangre periférica, sino que linfocitos procedentes de diferentes órganos linfoides poseen dicha capacidad, co mo se puede observar en la tabla 10. Los diferentes órganos linfoides presentan distinta distribución de las poblaciones linfocitarias, como nos lo demuestra el estudio de marcadores de superficie, y en consecuencia el porcentaje de células acti vadoras de complemento (CAC) varía según el órgano linfoide de procedencia.

La activación de complemento por células linfoides tiene especial importancia, porque la obtención de las mismas no re quiere el empleo de anticoagulantes ni de Ficoll, lo que descarta la posibilidad de que el fenómeno de activación observado en sangre periférica sea un artefacto debido a manipulaciones "in vitro".

TABLA 10

MARCADORES Y ACTIVACIÓN DE COMPLEMENTO POR LINFOCITOS PROCEDENTES DE DIFERENTES ORGANOS LINFÓIDES					
ORGANO LINFOIDE	Igs sup. (%)	E-SRBC (%)	EA (%)	EAC (%)	CAC (%)
Sangre					
Periférica	25 ± 9	62 ± 5	26 ± 7	16 ± 7	10 ± 6
Amígdala	36 ± 9	26 ± 8	29 ± 7	29 ± 5	18 ± 5
Bazo	30 ± 8	11 ± 9	70 ± 8	-	34 ± 10
Timo	-	-	-	-	1 ± 1

El siguiente paso fué identificar la subpoblación celular responsable del fenómeno de activación de complemento.

En el timo no existen células con capacidad de activar complemento. En las amígdalas no existen apenas macrófagos y persiste el fenómeno de activación de complemento, lo cual descarta que la fluorescencia sea debida a componentes del complemento sintetizados por los macrófagos (170, 219, 220).

Comparando los datos obtenidos (Tabla 10) con linfocitos de sangre periférica, de amígdalas y bazo, observamos que en estos dos últimos el aumento en el porcentaje de células activadoras respecto a sangre periférica va acompañado de un aumento del porcentaje de células con inmunoglobulinas de superficie.

Estos datos tomados en conjunto, nos hacían pensar en los linfocitos B como posibles responsables del fenómeno que estamos estudiando, pero era necesario comprobarlo trabajando con las diferentes poblaciones linfocitarias.

III.1.6. Activación de complemento por subpoblaciones de linfocitos de sangre periférica.

Las células mononucleadas de sangre periférica, desprovistas de macrófagos mediante tratamiento de la sangre con limaduras de hierro, se separaron en linfocitos T y no T (B+ nulas), como se indica en Materiales y Métodos.

En ambas subpoblaciones se estudiaron diferentes marcadores de superficie y la capacidad de activar complemento. La tabla 11 nos muestra que son los linfocitos no T, en los que existe un 70% de inmunoglobulinas de superficie, los que presentan en su membrana C3b originado por la activación de complemento, mientras que los linfocitos T carecen de esta propiedad.

III.1.7. Activación de complemento por diferentes subpoblaciones de linfocitos de amígdalas.

Linfocitos procedentes de amígdalas se separaron en células con receptores para hematíes de carnero (linfocitos T) y células que no poseían este receptor (linfocito no T). En ambas poblaciones estudiamos la presencia de inmunoglobulinas de superficie, encontrando que en los linfocitos no T se teñía, con un suero anti-inmunoglobulinas humanas totales, aproximadamente un 75% y en los linfocitos T solo lo hacía un 3%. (Tabla 12)

Las células con capacidad de activar complemento son un 35% de la población no T, mientras que dentro de la población T no hay células con esta capacidad.

Puesto que en la población no T hay un 75% de células con inmunoglobulinas de superficie y que el porcentaje restante corresponde a células nulas, el 35% de activación de complemento que observamos, puede corresponder tanto a los linfocitos B como a los nulos. Para saber que tipo celular era el responsable de la activación de complemento, eliminamos de la población

TABLA 11

MARCADORES Y ACTIVACIÓN DE COMPLEMENTO POR SUBPOBLACIONES DE SANGRE PERIFERICA					
	MÉTODO DE SEPARACIÓN	Igs	EA (%)	EAC (%)	CAC (%)
		Sup. (%)			
Población completa	-	25 ± 9	26 ± 7	15 ± 7	10 ± 6
Población T	Nylon	2 ± 1	8 ± 5	-	2 ± 1
Población no T	Rosetas-E	70 ± 6	-	-	40 ± 7

TABLA 12

MARCADORES Y ACTIVACIÓN DE COMPLEMENTO POR SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS DE AMÍGDALAS.

	Igs. sup. (%)	EA (%)	EAC (%)	CA (%)
Población completa	36 ± 9	26 ± 8	29 ± 5	18 ± 5
Población T	3 ± 2	-	13 ± 3	5 ± 1
Población no T	75 ± 10	26 ± 3	85 ± 10	39 ± 7
Población B	98 ± 3	-	-	60 ± 4

no T las células con receptores para el fragmento Fc de la IgG, obteniendo un 78% de células con inmunoglobulinas en su membrana e incrementándose hasta un 60% el porcentaje de células que activaban complemento. Por tanto, todo esto parece indicar que los linfocitos humanos normales, portadores de estructuras de membrana, capaces de activar complemento, son una subpoblación de los linfocitos B.

III.2. ESTUDIO FUNCIONAL DE LINFOCITOS B ACTIVADORES Y NO ACTIVADORES DE COMPLEMENTO.

III.2.1. Estudios de fluorescencia y tamaño con el FACS en linfocitos B de amígdalas.

Como ya hemos repetido en varias ocasiones, la activación de complemento la estudiamos por incubación de las células con SHN autólogo y posterior tinción de los fragmentos de C3 depositados sobre la membrana celular con un suero anti-C3 humano fluoresceinado. Contando estas células con un microscopio de fluorescencia, encontramos que existía aproximadamente un 39% de células entre los linfocitos B de amígdalas que presentaban fluorescencia de membrana. Mediante el FACS, se estudió la fluorescencia de estas células, obteniendo la gráfica de la figura 16, que representa el número de células frente a la intensidad de la fluorescencia. El FACS puede también darnos el tamaño celular basándose en la difracción que sufre la luz al incidir sobre las células en función de su tamaño. En la figura 17

se presenta el número de células frente a una difracción 6 a un tamaño creciente, para linfocitos B de amígdalas. El primer pico se ha comprobado que corresponde a células muertas. Comparando ambas figuras y eliminando este primer pico, se seleccionan entre unos determinados límites aquellas células que presentan fluorescencia de membrana frente a las negativas para este parámetro. En linfocitos B de amígdalas se encontró un 40% de células teñidas, corroborando los datos encontrados por microscopía.

III.2.2. Síntesis de DNA y secreción de inmunoglobulinas en respuesta a PWM de linfocitos B activadores y no activadores del sistema de complemento en presencia de células T autólogas.

Las células fueron separadas en dos poblaciones con (CAC +) y sin (CAC -) capacidad de activar complemento. Ambas se miraron al microscopio de fluorescencia, encontrando un 100% de células fluorescentes en la población activadora y un 0% de células teñidas en la población no activadora.

Elegimos un experimento representativo en el que seguimos el esquema de la figura 18.

En la tabla 13, podemos ver los datos de síntesis de DNA. Las células activadoras de complemento tienen una mayor proliferación celular, en respuesta a PWM, que las células no activadoras de complemento, tanto a día 5 como a día 7, y en las dos relaciones T/B estudiadas. La mayor diferencia la encon-

100

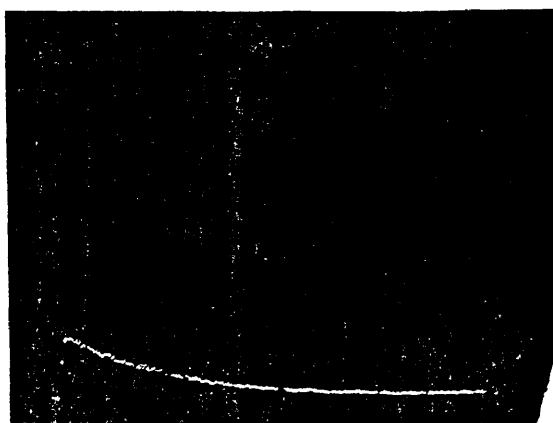


Figura 16. FLUORESCENCIA DE LINFOCITOS B DE AMIGDALAS TEÑI-
DOS CON ANTI-C3 HUMANO, PREVIA INCUBACION CON SHN.

161

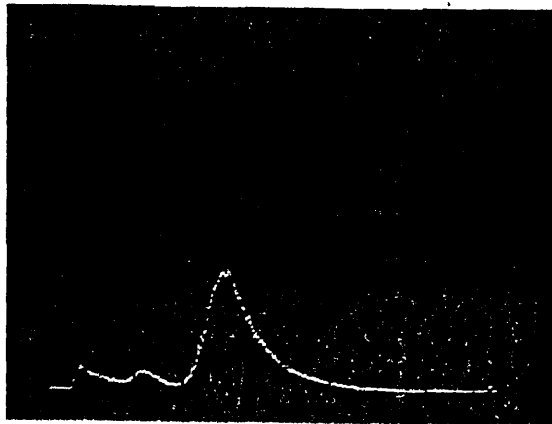


Figura 17. DIFRACCION QUE SUFRE LA LUZ AL INCIDIR SOBRE
LINFOCITOS B DE AMIGDALAS.

tramos a día 7 de cultivo en la relación T/B = 5/1 donde las células activadoras de complemento incorporan timidina- H^3 originando 236244 cpm, y las no activadoras 1276 cpm frente a 4323 cpm del control.. Es decir, las células activadoras de complemento tienen una mayor proliferación en respuesta a PWM.

Como anteriormente hemos indicado, también estudiamos secreción de inmunoglobulinas después de 10 días en cultivo. En la tabla 14, se pueden ver las concentraciones de IgG é IgM secretadas por las células AC + y AC -, a la relación T/B = 5/1. La población activadora de complemento secreta la misma cantidad, 243ng/ml de IgG y 660ng/ml de IgM, que el control, 230ng/ml de IgG y 663ng/ml de IgM; mientras que la secreción por parte de la población negativa es 61ng/ml de IgG y 223ng/ml de IgM.

Estos datos parecen sugerir que la población de células que responde a PWM y se transforma en células plasmáticas, capaces de secretar anticuerpos, es la población de linfocitos B que tienen capacidad de activar el sistema de complemento.

III.3. ACTIVACIÓN DE COMPLEMENTO DE LINFOBLASTOS T

Anteriormente hemos descrito que una subpoblación de linfocitos B, procedentes de diferentes órganos linfoides, presentaban la capacidad de activar el sistema del complemento, mientras que linfocitos T y timocitos no tenían dicha capacidad. A continuación, nos planteamos si la transformación blástica que conlleva una serie de cambios a nivel de la membrana citoplasmática

FIGURA 11

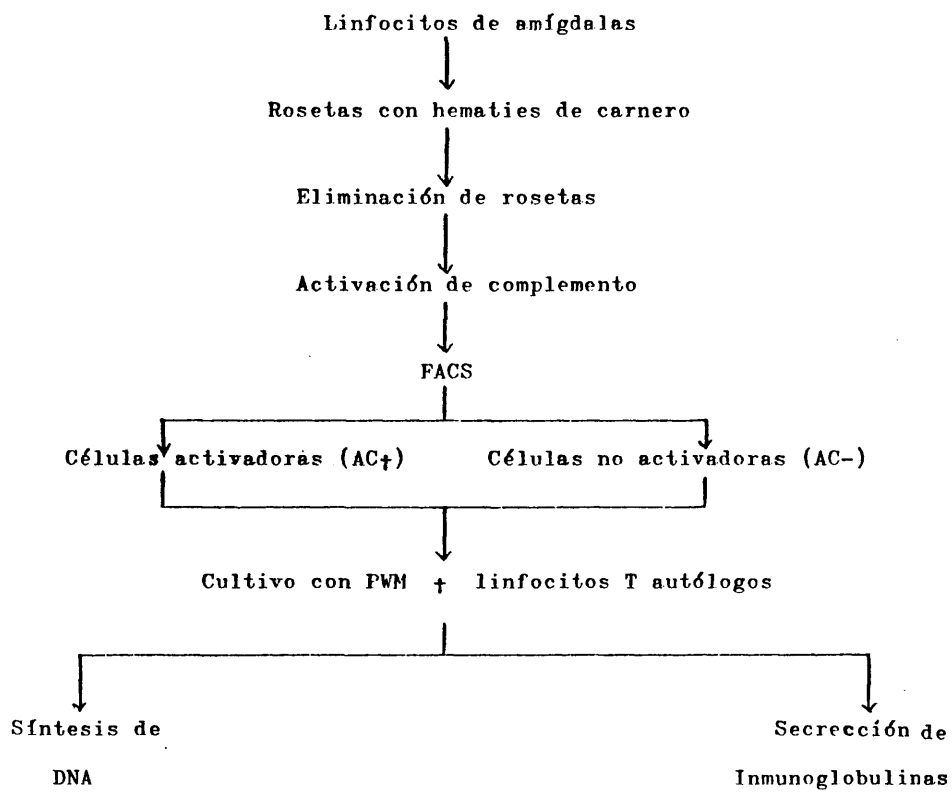
SEPARACIÓN DE LINFOCITOS MEDIANTE EL FACS

TABLA 13

SÍNTESIS DE DNA POR LINFOCITOS B HUMANOS SEPARADOS MEDIANTE EL FACS EN CAC+ Y CAC-.

	RELACIÓN T/B 1/1		RELACIÓN T/B 5/1			
	-		DIA 5		DIA 7	
	(cpm)	PWM	-	PWM (cpm)	-	PWM
CONTROL	180 \pm 90 [*]	2446 \pm 731	-	-	1188 \pm 151	4323 \pm 30
CAC +	292 \pm 180	9363 \pm 708	307 \pm 36	4690 \pm 1005	1007 \pm 283	2362 \pm 131 [*]
CAC -	150 \pm 58	844 \pm 140	-	820 \pm 77	899 \pm 14	1276 \pm 55 ^o

104

^{*} Estos datos son los valores medios \pm desviación estandar de triplicados de un experimento.

TABLA 14

SINTESIS DE IgG E IgM POR LINFOCITOS B HUMANOS SEPARADOS MEDIANTE EL FACS EN + CAC + Y CAC-.

	RELACION T/B 5/1		RELACION T/B 5/1	
	IgG* (ng / ml)		IgM* (ng / ml)	
	-	PWM	-	PWM
CONTROL	165 \pm 35	230 \pm 60	80 \pm 0	633 \pm 50
CAC +	-	243 \pm 21	-	660 \pm 36
CAC -	1.4 \pm 1.0	61 \pm 23	1.4 \pm 1.3	223 \pm 32

105

* Concentraciones de IgG é IgM en los sobrenadantes despues de 10 días de cultivo.

"podría influir en el fenómeno de activación de complemento.

La transformación blástica puede llevarse a cabo por estimulación mitogénica ó antigénica.

Comprobamos qué mitógenos podríamos utilizar que no activasen o aceptasen complemento pasivamente. En la tabla 15 se puede ver que después de incubar durante 30 min. las células con PHA, el 90% de ellas han unido este mitógeno a su membrana (se tiñen con un suero anti-PHA fluoresceinado) y esta unión no modifica los valores de activación de complemento; sin embargo, en el caso de otro mitógeno de células T, Con A, su unión a los receptores mitogénicos de los linfocitos aumenta hasta un 80% los valores de activación de complemento. Como consecuencia en todos nuestros experimentos utilizamos PHA como mitógeno.

III.3.1. Activación de complemento por linfoblastos obtenidos por estimulación de linfocitos de sangre periférica con PHA. Cinética.

Células mononucleadas de sangre periférica se incubaron en presencia y ausencia de PHA. Después de 2 ó 3 días en cultivo se estudió la activación de complemento por estas células. Como puede observarse en la tabla 16, en las células que se habían mantenido en estado de reposo, nos encontramos con un porcentaje muy bajo (5%) de células que presentan fluorescencia de membrana; sin embargo, cuando estas células habían sido estimuladas policlonalmente con PHA existía un 36% que activaban el sistema del complemento.

TABLA 15

EFFECTO DE DIFERENTES MITÓGENOS SOBRE LA ACTIVACIÓN DE COMPLEMENTO
POR LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA.

MITÓGENO [†]	CELULAS CON MITÓGENO EN SU MEMBRANA. (%) ^{‡‡}	ACTIVACIÓN DE COMPLEMENTO(%)
PHA 1%	100	9
Con A 10 µg/ml	95	80

[†] Los linfocitos de sangre periférica se incubaron durante 30 minutos a 37°C con el mitógeno indicado.

^{‡‡} Se observó con sueros anti-PHA y anti-ConA fluoresceinados.

TABLA 16

ACTIVACIÓN DE COMPLEMENTO POR LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA
ESTIMULADOS CON PHA.

FUENTE DE COMPLEMENTO	CAC (%)	
	-PHA	+PHA
SHN autólogo	5.0 \pm 2.3	36.0 \pm 12.1
SHN absorbido [†]	6.1 \pm 1.3	34.3 \pm 9.1
SHN 56°C 30 min.	0.5 \pm 0.3	2.1 \pm 0.5
SHN + EDTA 0.01M	1.0 \pm 0.5	0.3 \pm 0.1
SHN+EGTA 0.01M+Cl ₂ Mg 0.7 mM	-	29.0 \pm 8.2
SHN 52°C 20 ^o min.	1.1 \pm 0.2	0.2 \pm 0.1
Suero agammaglobulinémico ^{††}	3.0 \pm 1.4	-
PBS/BSA	0.1 \pm 0.3	1.3 \pm 0.5

[†] El suero se absorbió con las propias células durante 1 hora a 4°C.

^{††} Este suero contenía menos de 50 μ g/ml de IgG, IgM e IgA.

Esta activación es independiente de la presencia de anticuerpos, ya que cuando se utilizaron como fuente de complemento suero previamente absorbido o suero de un paciente con agammaglobulinemia, los valores de activación de complemento no varían. Parece tener lugar por la vía alternativa, porque el pretratamiento del suero con EDTA hace desaparecer la tinción fluorescente, y sin embargo esta permanece cuando el suero se ha tratado con EGTA y suplementado con Cl_2Mg . Es decir, en todos los controles estudiados obtenemos resultados análogos a los obtenidos en el caso de linfocitos no activados.

Según estos datos, vemos que la capacidad de activar complemento aparece después que los linfocitos T han sufrido la transformación blástica, ya que en "estado de reposo" no la poseen. Ante esto, consideramos interesante estudiar como varía esta capacidad a lo largo de los diferentes días de cultivo, para ello hicimos una cinética del porcentaje de células activadoras de complemento y de síntesis de DNA.

Los resultados obtenidos aparecen en la figura 19. El máximo número de CAC aparece en el día 3 de cultivo y coincide con el pico de síntesis de DNA. A partir del día 4, esta decrece hasta niveles basales, mientras que el valor de la activación de complemento se estabiliza alrededor de un 20%. Esto nos indica que una vez los linfocitos T se han diferenciado a linfoblastos, existe una subpoblación de estos que activan complemento, independiente de la fase del ciclo celular.

Teniendo en cuenta que la PHA es un mitógeno de linfocitos T, pensamos que las células que presentaban capacidad de acti-

var complemento deben ser linfoblastos T, no obstante y debido a que la PHA puede activar células B a través de las T activadas, debíamos comprobarlo trabajando con una población pura de linfocitos T, que fuese estimulada con PHA.

III.3.2. Activación de complemento por linfoblastos obtenidos por estimulación mitogénica de linfocitos T de sangre periférica.

Linfocitos T de sangre periférica, obtenidos por columnas de nylon, se cultivaron en presencia y ausencia de PHA. Cuando las células se mantuvieron en cultivo sin PHA, nos encontramos que no existían CAC como era de esperar (Tabla 17). Sin embargo, cuando los linfocitos T eran cultivados en presencia de PHA aparecía un 12% de linfoblastos activadores del complemento (Tabla 17). (221).

La disminución en el porcentaje de CAC encontrada en este caso respecto a la tabla anterior, puede deberse a la menor respuesta proliferativa a PHA de los linfocitos T purificados (como consecuencia de la eliminación de macrófagos), ó bien a que en el caso de estimulación de linfocitos totales con PHA se originen linfoblastos B capaces de activar el sistema de complemento. De cualquier manera, es claro que existe una subpoblación de linfoblastos T capaces de activar el complemento.

Como en los casos anteriores, la activación de complemento es independiente de la presencia de anticuerpos y parece tener lugar por la vía alternativa como nos lo indican los valores

III

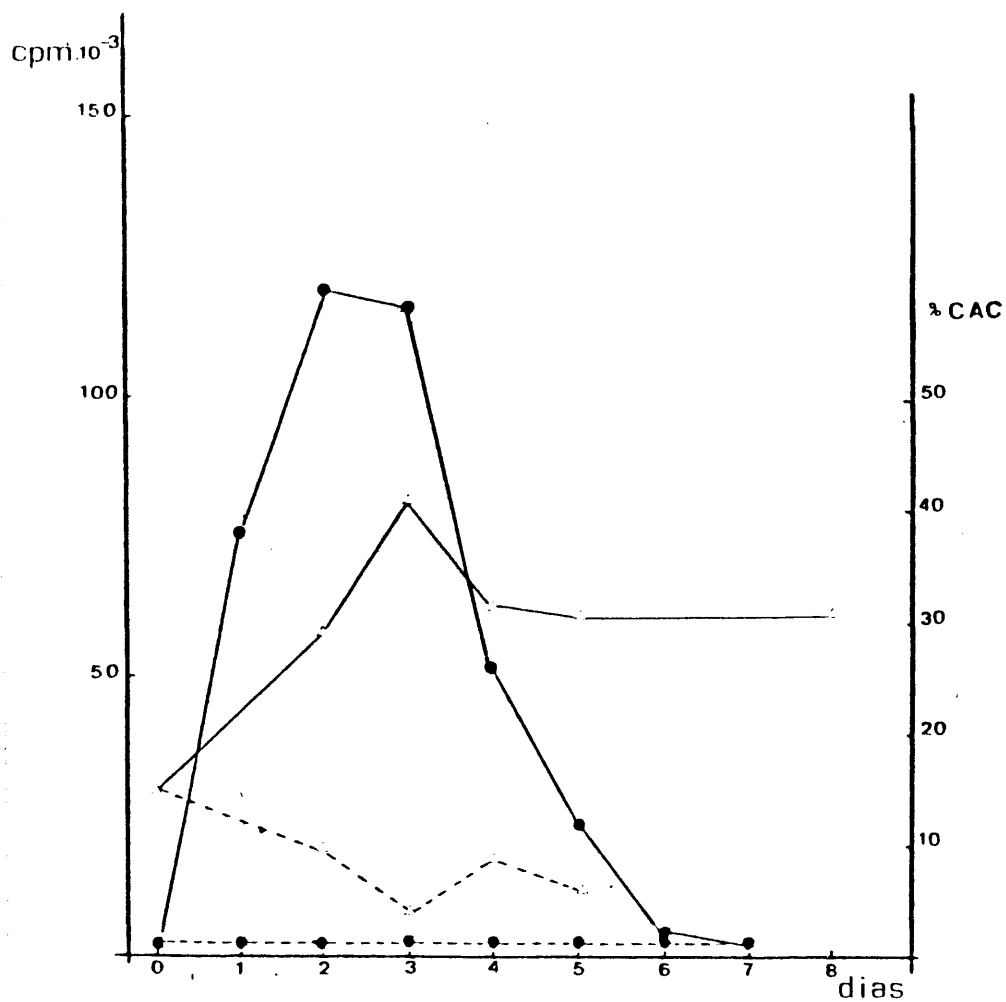


Figura 19. CINETICA DE ACTIVACION DE COMPLEMENTO POR LINFOBLASTOS DE SANGRE PERIFERICA.

Síntesis de DNA en presencia (●—●) y ausencia de PHA. Células activadoras de complemento (CAC) linfocitos activados con PHA (△—△) y " en reposo (△---△).



obtenidos en los controles realizados.

III.3.3. Activación de complemento por linfoblastos obtenidos por estimulación alogénica.

Una vez visto que como consecuencia de la blastogénesis producida por estimulación mitogénica aparecía una subpoblación de linfoblastos T que activaban complemento, estudiamos lo que ocurría en el caso de una estimulación antigénica. Elegimos como método de dicha estimulación el cultivo mixto de linfocitos, donde el agente estimulador son los antígenos de histocompatibilidad de la clase II, que debido a su gran polimorfismo se presentan en diferentes formas según los individuos. Estas estructuras responsables de la estimulación están presentes en linfocitos B, macrófagos y esperma, y son escasos o están ausentes en linfocitos T frescos (222). Los linfocitos respondedores son los linfocitos T.

Estudiamos la activación de complemento en células, obtenidas en un cultivo mixto de linfocitos, mediante la técnica habitual de fluorescencia y por medida de la capacidad hemolítica del SHN autólogo después de la incubación con las células.

En la tabla 18 se pueden observar que existe entre un 9 y un 20% de células que fijan C3b en su membrana, y que la actividad hemolítica del suero desciende aproximadamente un 25% cuando ha sido previamente incubado con las células, lo que nos indica que estas han activado el sistema del complemento,

TABLA II

ACTIVACIÓN DE COMPLEMENTO POR LINFOBLASTOS T OBTENIDOS POR ESTIMULACIÓN MITÓGENICA DE LINFOCITOS T DE SANGRE PERIFÉRICA CON PHA.

FUENTE DE COMPLEMENTO	CAC (%)	
	-PHA	+PHA
SHN autólogo	1.0 \pm 0.2	12.1 \pm 4.2
SHN autólogo + EDTA 0.01M	1.1 \pm 0.5	0.3 \pm 0.2
SHN autólogo + EGTA 0.01M+Cl ₂ Mg0.7mM	0.7 \pm 0.3	7.8 \pm 3.2
SHN 56°C 30 min.	1.0 \pm 0.5	2.0 \pm 0.8
SHN 52°C 20 min.	1.1 \pm 0.3	1.2 \pm 0.3
Suero agammaglobulinémico*	1.3 \pm 0.2	14.1 \pm 3.7
PBS/BSA	1.0 \pm 0.6	0.5 \pm 0.3
SHN absorbido **	0.5 \pm 0.4	10.2 \pm 3.7

* Este suero contenía menos de 50 μ g/ml de IgG, IgM é IgA.

** El suero se absorbió con las propias células durante 1 hora a 4°C.

ya que ha existido un consumo del mismo.

Con el fin de analizar si las células activadoras de complemento eran blastos ó linfocitos no estimulados, se sometieron a un gradiente discontinuo de Percoll, que las separa en base a su densidad, y se recogieron diferentes bandas (ver esquema de Materiales y Métodos).

Para ver en cual de estas bandas se encontraban los linfoblastos se estudió la capacidad espontánea de incorporación de timidina- H^3 durante 4 horas. Como puede observarse en la tabla 19, en la fracción denominada 40 se encontraban las células transformadas con capacidad de sintetizar DNA, mientras que la fracción 50 estaba formada por "pequeños" linfocitos. Estos datos se corroboraron por criterios morfológicos. La fracción 30 estaba principalmente formada por fragmentos celulares.

III.3.4. Marcadores de superficie y activación de complemento en las diferentes fracciones de un gradiente discontinuo de Percoll de las células de un cultivo mixto.

Se estudió en las diferentes fracciones del gradiente discontinuo de Percoll la capacidad que las células tenían de activar el sistema del complemento. Se encontró (Tabla 20) que la fracción 40, en la cual se encontraban los linfoblastos, (como hemos visto anteriormente por los datos de síntesis de DNA), es la que presentaba una población de CAC, mientras que en la fracción 50, que correspondía a células no estimuladas, no

TABLA 18

ACTIVACIÓN DE COMPLEMENTO POR CELULAS TOTALES DE UN CULTIVO MIXTO DE LINFOCITOS

	CAC (%)	ACTIVIDAD HEMOLITICA	
		CH50	INHIBICIÓN (%) ^{***}
Experimento 1	20	238 (323) [*]	26.0
Experimento 2	9	385 (490)	22.0
Experimento 3	14	415 (555)	25.3

^{*} Los datos entre parentesis indican las unidades CH50 del SHN incubado a 37°C en ausencia de células.

^{***} Se calculó considerando como 100% las unidades CH50 del SHN incubado a 37°C sin células.

TABLA 19

SÍNTESIS DE DNA DE LAS DIFERENTES FRACCIONES DEL PERCOLL DE UN CULTIVO MIXTO DE LINFOCITOS

FRACCIONES PERCOLL	RECUPERACIÓN (%)	SÍNTESIS DE DNA (cpm) [†]		
		EXP. 1	EXP. 2	EXP. 3
Fracción 30	1,6 ± 1	370 ± 1150	2164 ± 291	789 ± 75
Fracción 40	10,5 ± 4	27930 ± 2335	17123 ± 829	47738 ± 1257
Fracción 50	25 ± 7	372 ± 45	3389 ± 140	3961 ± 736

[†] La síntesis de DNA se detectó como incorporación espontánea de timidina-³H durante 4 horas.

existía ninguna célula con capacidad de activar el sistema del complemento.

Estos datos nos indican que después de la transformación blástica, debida a estimulación con antígenos de membrana, se producen cambios en la membrana citoplasmática responsables de la activación de complemento en una subpoblación de linfoblastos, análogamente a lo que ocurría en el caso de la estimulación mitogénica con PHA.

Con el fin de determinar que tipo de célula era la responsable de la activación se hicieron marcadores de superficie en las diferentes fracciones del Percoll. Los bajos porcentajes de inmunoglobulinas de superficie (3%) y de receptores para complemento (2%) en la fracción 40 (Tabla 20), así como la existencia de un 70% de células con receptores para hematies de carnero indicaba que las células activadoras de complemento podían ser linfoblastos T. Para confirmar esto, se realizó un cultivo mixto en que las células respondedoras eran linfocitos T de sangre periférica, purificadas a través de columnas de nylon.

III.3.5. Activación de complemento por linfoblastos T de un cultivo mixto.

Linfocitos T, purificados a través de columnas de nylon, se estimularon con linfocitos totales de otro individuo no relacionado, previamente tratados con mitomicina. Después de 7 días de cultivo, las células se sometieron a un gradiente discontinuo

de Percoll y en las diferentes fracciones se estudió la activación de complemento.

En la tabla 21 se puede ver que en la fracción 40 existe un 10% de células activadoras de complemento, valor análogo al que encontrábamos cuando la población respondedora en el cultivo mixto eran linfocitos totales de sangre periférica. Es decir, los linfoblastos de la fracción 40, capaces de activar complemento son linfoblastos T.

III.3.6. El crecimiento de los linfoblastos activadores de complemento es dependiente de IL-2.

La interleuquina 2 (IL-2) anteriormente denominada TCGF ("T cell growth factor") es un factor que se encuentra en los sobrenadantes de los cultivos de células activadas mitogénicamente (223, 224) y antigénicamente (225). Esta interleuquina es capaz de mantener células T "in vitro" en un estado de continua proliferación (225).

Se ha visto que linfocitos T no activan complemento, y que esta capacidad aparecía en esta población celular después de la estimulación mitogénica o alogénica. A continuación, estudiamos si los linfoblastos activadores podrían mantenerse en cultivo prolongado en presencia de IL-2. Para ello, linfocitos de sangre periférica cultivados con PHA se recogieron a día 2 y 3 de cultivo (en los cuales el valor de la activación de complemento es diferente), se pusieron en presencia de IL-2 y a diferentes días se estudió la síntesis de DNA y la

TABLA 20

MARCADORES DE SUPERFICIE Y ACTIVACIÓN DE COMPLEMENTO EN LAS DIFERENTES FRACCIONES DEL PERCOLL DE UN CULTIVO MIXTO DE LINFOCITOS.

FRACCIONES DEL PERCOLL	Igs. sup. (%)	E (%)	EA (%)	EAC (%)	CAC (%)
Fracción 40	3 ± 1	69 ± 7	12 ± 4	2 ± 1	11 ± 3
Fracción 50	0 ± 0	93 ± 3	8 ± 2	1 ± 1	0

TABLA 21

120

ACTIVACIÓN DE COMPLEMENTO POR LINFOBLASTOS T DE UN CULTIVO MIXTO

FRACCIONES DEL PERCOLL	CAC (%) *
------------------------	-----------

Población completa	5.0 \pm 0.9
--------------------	---------------

Fracción 40	9.6 \pm 0.4
-------------	---------------

Fracción 50	2.0 \pm 2.0
-------------	---------------

* Se utilizaron como células respondedoras linfocitos T de sangre periférica purificados por columnas de nylon.

capacidad de activar complemento, obteniéndose las cinéticas que se presentan en la figura 20.

En dicha figura se puede observar que la proporción de células activadoras aumentó en los primeros días del cultivo hasta valores próximos a un 60%, estabilizándose en los días finales en porcentajes alrededor de un 20% (tanto cuando las células se recogieron a día 2 de cultivo como cuando se recogieron a día 3). Es decir, como en el caso de la estimulación con PHA, nos encontramos un valor máximo de CAC próximo al pico de síntesis de DNA, y un valor estabilizado en los días finales del cultivo, cuando apenas existe incorporación de timidina- H^3 .

Este aumento que sufre la población activadora de complemento como consecuencia del cultivo en presencia de IL-2, nos sugiere que el crecimiento de estos linfoblastos es dependiente de esta interleuquina.

Posteriormente, separamos las células en CAC + y CAC - mediante el FACS y estudiamos su respuesta a IL-2.

III.3.7. Separación de linfoblastos activadores y no activadores de complemento.

III.3.7.1. Estudio de fluorescencia y tamaño con el FACS de linfoblastos obtenidos por estimulación con PHA de linfocitos totales de sangre periférica.

Los linfoblastos obtenidos por estimulación mitogénica con

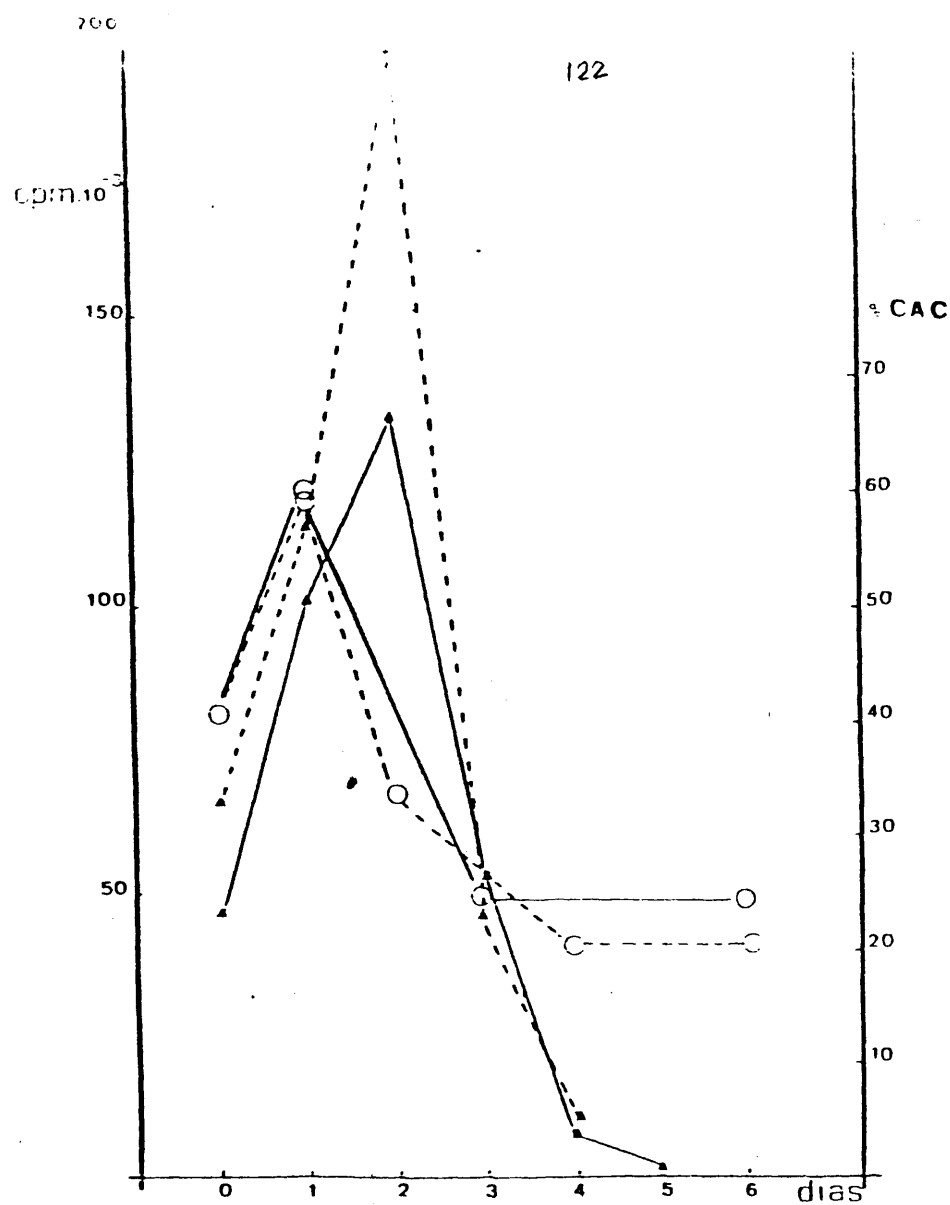


Figura 20. CINETICA DE ACTIVACION DE COMPLEMENTO POR LINFOBLASTOS MANTENIDOS EN CULTIVO PROLONGADO CON IL-2.

Células recogidas el segundo día del cultivo con PHA: síntesis de DNA (\blacktriangle — \blacktriangle) y activación de complemento (\circ — \circ). Analogamente para células recogidas el tercer día (---).

100% y sometidos a activación de complemento, se estudiaron con el FACS. En la figura 21 se representa el número de células frente a la intensidad de fluorescencia y en la figura 22 el número de células frente al tamaño celular. Comparando ambas gráficas, se seleccionan entre unos determinados límites aquellas células que presentan fluorescencia de membrana frente a las negativas para este parámetro. El porcentaje de linfoblastos fluorescentes analizados de esta manera (32%) es similar al encontrado por conteo con el microscopio de fluorescencia (29%).

III.3.7.2. Síntesis de DNA de linfoblastos activadores y no activadores del sistema del complemento en respuesta a IL-2.

Los linfoblastos, una vez incubados con SHN autólogo y anti-C3 humano fluoresceinado (FITC), se separaron en CAC + y CAC - mediante el FACS. El porcentaje de células fluorescentes en la población CAC + era de un 94%, mientras que en la CAC - solo había un 3% de células teñidas. La incubación a 37°C durante 18 horas no eliminó los complejos C3-anti-C3-FITC de la membrana de las células teñidas.

Las CAC +, CAC -, así como los linfoblastos no separados e igualmente incubados con SHN y anti-C3-FITC se cultivaron en presencia de IL-2.

Los resultados de la síntesis de DNA de estos cultivos aparecen en la figura 23, donde claramente puede observarse que

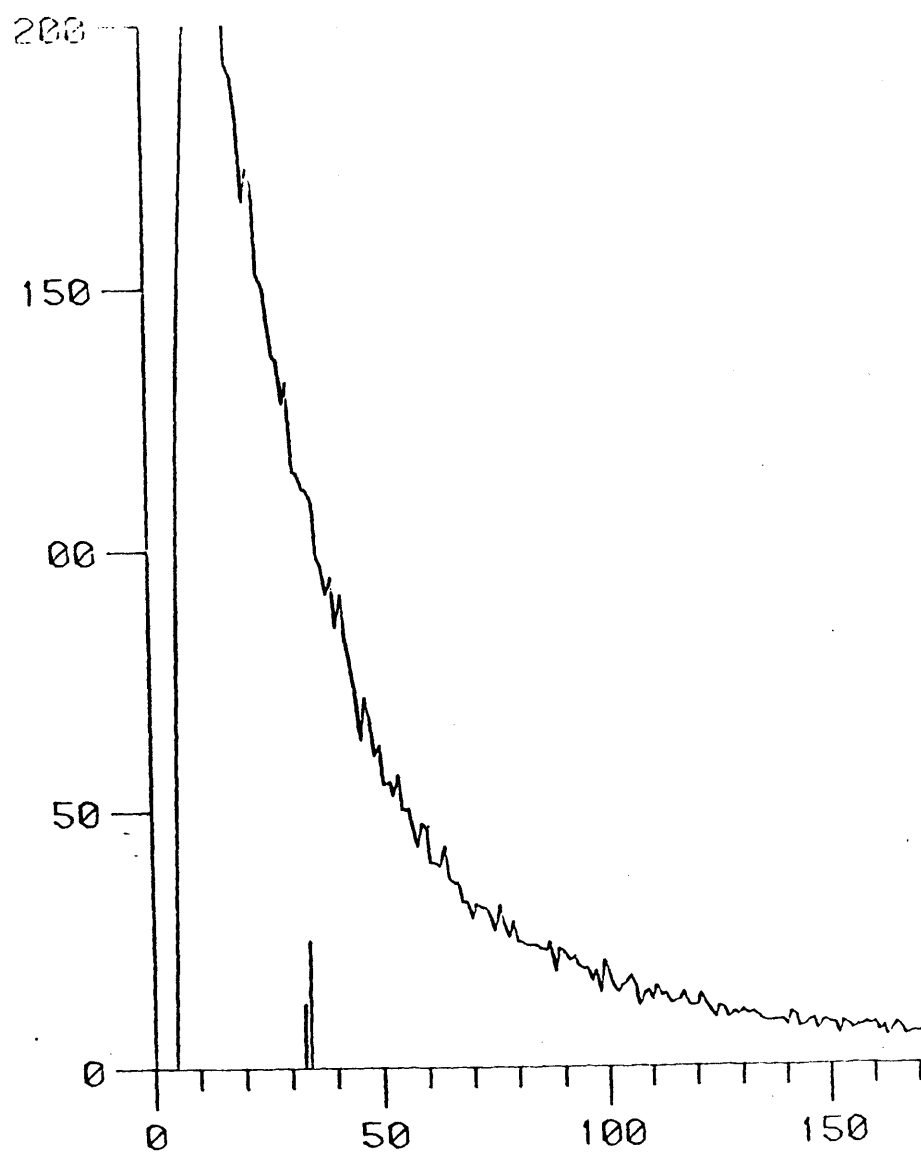


Figura 21. FLUORESCENCIA DE LINFOBLASTOS DE SANGRE PERIFERICA
TENIDOS CON ANTI-C3 HUMANO, PREVIA INCUBACION CON SHN.

125

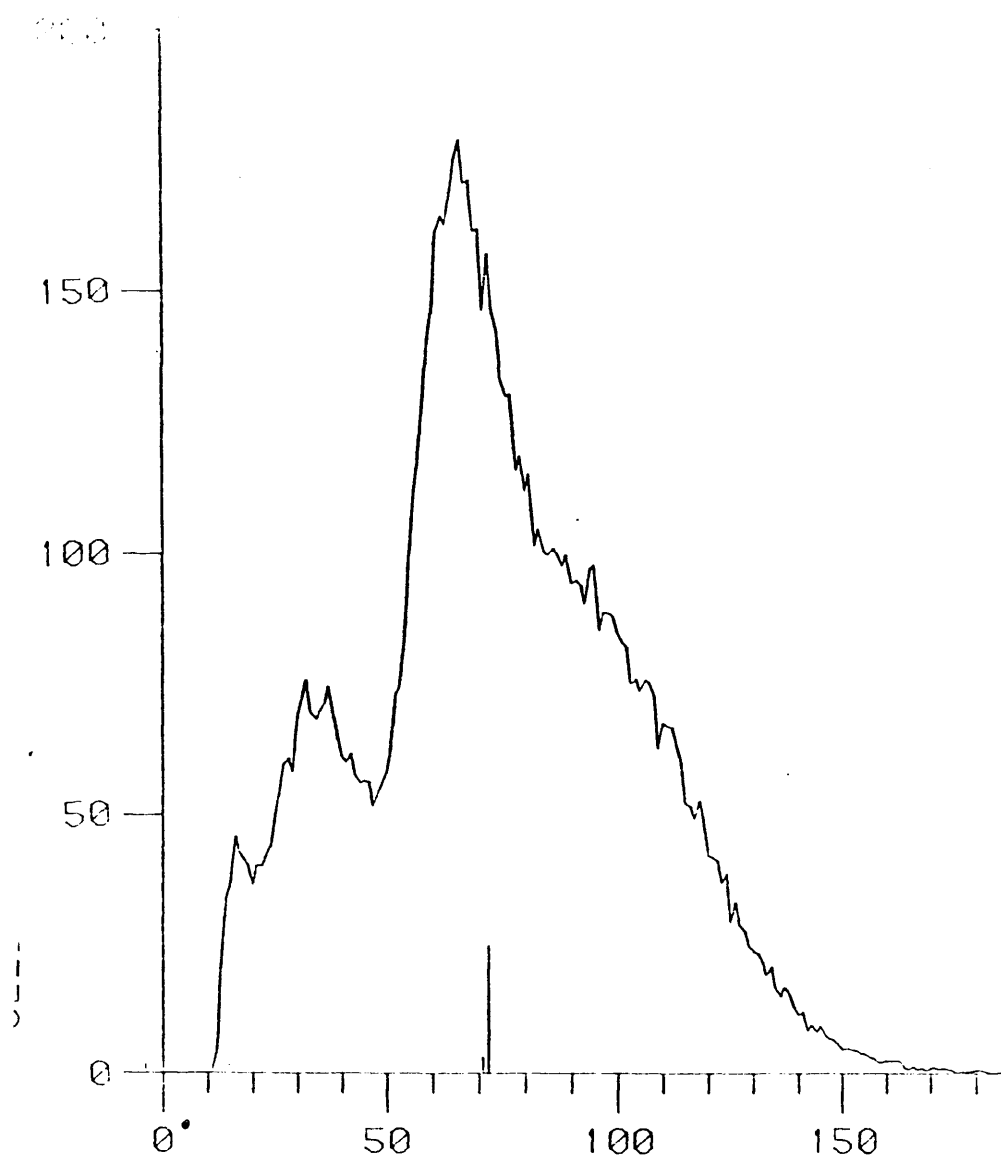


Figura 22. DIFRACCION QUE SUFRE LA LUZ AL INCIDIR SOBRE LINFOBLASTOS DE SANGRE PERIFERICA.

la respuesta a IL-2 es muy superior en los linfoblastos activadores de complemento frente a los no activadores y a los controles. También la población completa, en la que se había rea-lizado la activación de complemento, tiene una proliferación en respuesta a IL-2 superior al control de linfoblastos, no sometidos a activación. Por tanto, cabe la posibilidad de que la mayor proliferación encontrada en la población CAC + sea debi-da a que el 96% de las células llevan C3-anti-C3-FITC en su membrana.

Sin embargo, después de 4 días en cultivo solamente un 15% de CAC + tienen fluorescencia en su membrana y su prolife-ración en respuesta a un nuevo estímulo con IL-2 es muy supe-rior respecto a las CAC - y al control, como puede observarse en la figura 24.

Refiriendo estos datos a los linfoblastos no separados y no sometidos a activación de complemento y considerando la sín-tesis de DNA de estos como el 100% (tabla 22) observamos que esta síntesis en la población CAC + es aproximadamente un 250%, valor que se mantiene a día 3, 4 y 6 de cultivo, aunque el por-centaje de células teñidas haya descendido hasta un 15%.

Los porcentajes de síntesis de DNA de los linfoblastos no separados y sometidos a activación de complemento, son en todos los casos superiores al control y a los de las CAC -, pero aná-logamente se mantienen siempre constantes.

Ante todo esto, podemos concluir que los complejos C3-anti-C3-FITC no pueden explicar las diferencias encontradas en sín-te

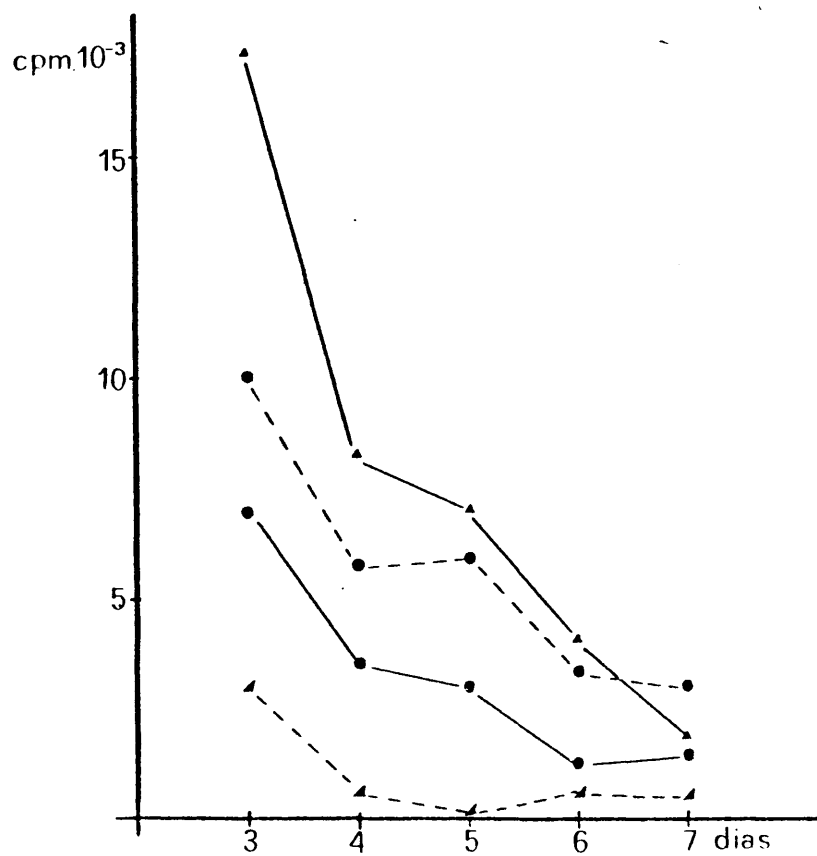


Figura 23. SINTESIS DE DNA DE CAC+ Y CAC- EN RESPUESTA A IL-2(I).

Linfoblastos de sangre periférica sometidos (●---●) y no sometidos (●—●) a activación de complemento, CAC+ (▲—▲) y CAC- (▲---▲) se pusieron en cultivo con IL-2.

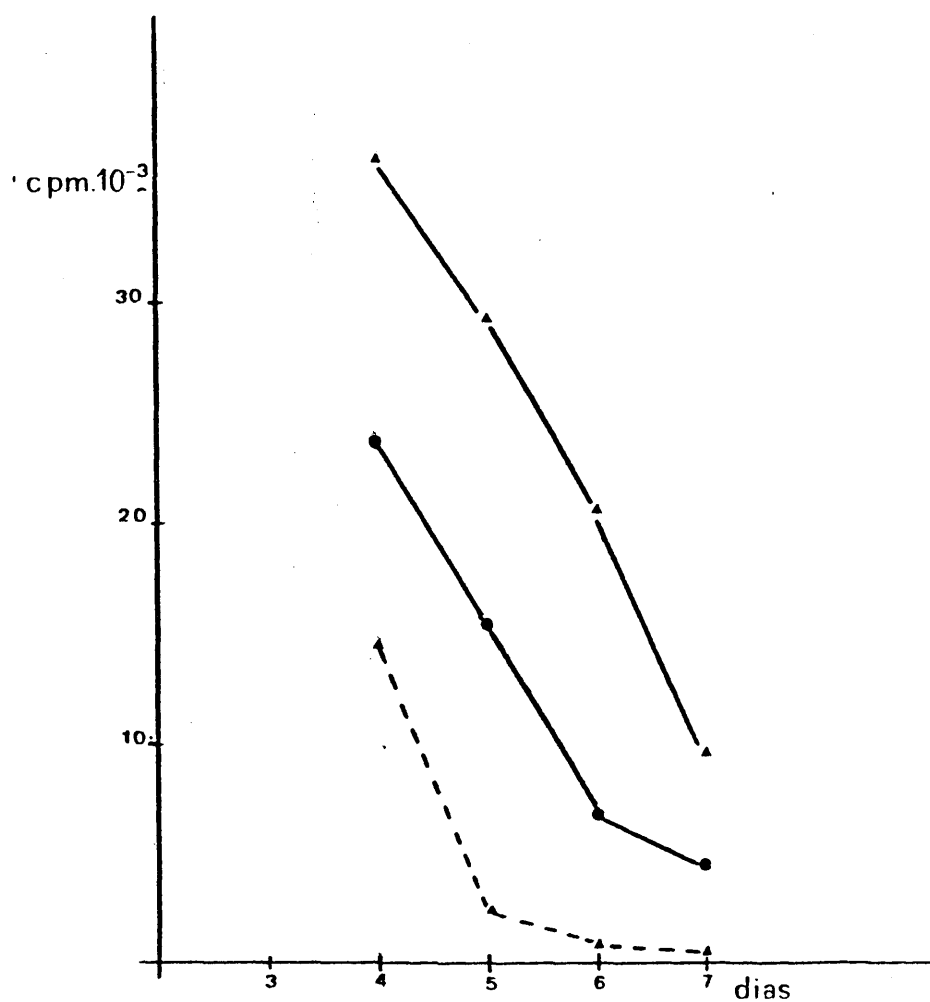


Figura 24. SINTESIS DE DNA DE CAC+ Y CAC- EN RESPUESTA A IL-2 (II).

Linfoblastos de sangre periférica (●—●), CAC+ (▲—▲) y CAC- (▲- -▲) se lavaron y se cultivaron nuevamente con IL-2. En la población CAC+ permanecía teñido un 15% de células.

TABLA 22

VARIACIONES DE LA SÍNTESIS DE DNA DE LINFOBLASTOS CAC+ Y CAC- RESPECTO AL CONTROL EN RESPUESTA A IL-2.

SÍNTESIS DNA FRENTE AL CONTROL (%)

	DIA 3	DIA 4	DIA 6 *
CONTROL	100	100	100
CONTROL - AC***	141	166	147
CAC +	243	228	257**
CAC -	41	17	61
			129

* Las células se lavaron y se cultivaron de nuevo con medio conteniendo IL-2.

** Un 15% de células CAC + permanecían teñidas..

*** Linfoblastos no separados y sometidos a activación de complemento.

sis de DNA en respuesta a IL-2, entre las células activadoras y no activadoras del sistema de complemento, pudiendo concluir que las CAC + tienen una mayor capacidad proliferativa que las CAC -, en presencia de IL-2.

III.4. COMPONENTES DE MEMBRANA QUE PUEDEN INFLUIR EN LA ACTIVACIÓN DE COMPLEMENTO.

III.4.1. Papel del ácido siálico en la activación de complemento.

Una característica bioquímica que determina la capacidad de una partícula para activar el sistema del complemento es una relativa deficiencia en ácido siálico. (129).

III.4.1.1. Efecto del tratamiento con neuraminidasa sobre la activación de complemento por linfocitos de amígdalas.

Para estudiar el papel que tiene el ácido siálico en la activación de complemento tratamos las células con neuraminidasa, enzima que elimina este ácido de las membranas. A continuación, se estudió la activación de complemento que producían estas células tratadas.

En primer lugar, probamos diferentes dosis de neuraminidasa (Tabla 23) con el fin de encontrar aquella que produjese el mínimo daño celular. Elegimos como concentración idónea

TABLA 23

EFFECTO DE DIFERENTES DOSIS DE NEURAMINIDASA SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR.

DOSIS DE NEURAMINIDASA*	VIABILIDAD CELULAR (% CELULAS VIVAS)
----------------------------	---

0.05 u/2x10 ⁶ células	93
0.10 u/2x10 ⁶ células	90
0.15 u/2x10 ⁶ células	85
0.20 u/2x10 ⁶ células	78

* Las células se incubaron a 37°C con neuraminidasa durante 30 minutos.

0.1 u/2x10⁶ células, con la cual permaneció viable un 90% de las células después del tratamiento enzimático. Una vez establecida la dosis idónea de neuraminidasa, se estudió la activación de complemento con y sin previo tratamiento con esta enzima. Como puede observarse en la tabla 24, el tratamiento con neuraminidasa aumenta el porcentaje de células activadoras de complemento tanto en la población completa como en las dos poblaciones T y no T, una vez separadas.

Este aumento es mayor en el caso de los linfocitos T.

III.4.1.2. Efecto del tratamiento con neuraminidasa sobre la activación de complemento por linfoblastos.

En la tabla 25 se puede ver que después del tratamiento con neuraminidasa la activación de complemento aumenta tanto cuando los linfocitos de sangre periférica se han cultivado en presencia como en ausencia de PHA, pasando de un 38% a un 62% en los linfoblastos y de un 5% a un 32% en los linfocitos "en reposo".

La eliminación del ácido siálico de las membranas citoplasmáticas convierte células no activadoras del complemento en activadoras, pero la transformación no es del 100%, como se ha descrito en el caso de hematies de carnero (129). Entre los linfocitos, parece que existen células que potencialmente pueden activar complemento, si se elimina el ácido siálico de su membrana, pero existen otras células que no son capaces de activar complemento aunque este compuesto haya sido eliminado.

TABLA 24

EFEECTO DEL TRATAMIENTO CON NEURAMINIDASA SOBRE LA ACTIVACION DE COMPLEMENTO POR LINFOCITOS DE AMIGDALAS.

TRATAMIENTO	CAC (%)			T
	POBLACION COMPLETA	NO T	T	
Ninguno	20.0 ± 5.3*	39.5 ± 9.0	5.2 ± 0.9	123
Neuraminidasa (0.1u/2x10 ⁶)	28.8 ± 2.7	49.1 ± 11.1	20.5 ± 3.4	

* En las tres poblaciones estudiadas las diferencias obtenidas en CAC, con ó sin tratamiento con neuraminidasa, son significativos (p/0.05).

TABLA 25

134

EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON NEURAMINIDASA SOBRE LA ACTIVACIÓN
DE COMPLEMENTO POR LINFOBLASTOS DE SANGRE PERIFÉRICA.

TRATAMIENTO	PBL *	
	- PHA	+ PHA
	CAC (%)	
Ninguno	5.0 ± 2.5	38.3 ± 7.2
Neuraminidasa ** (0. 10u/2x10 ⁶)	32.3 ± 10.0	62.6 ± 16.0

* Los linfocitos de sangre periférica se activaron durante
3 días en presencia y ausencia de PHA.

** Las células se trataron con neuraminidasa a 37°C durante
30 min. y se sometieron a activación de complemento.

III.4.2. Efecto de la carga eléctrica sobre la activación de complemento.

Diferentes estudios sobre la movilidad electroforética (ME) de células linfoides han demostrado que linfocitos T y timocitos resistentes a hidrocortisona tienen una marcada movilidad hacia el ánodo, mientras que linfocitos B y el resto de los timocitos tienen una movilidad significativamente mas baja (226, 227).

Además se ha descrito una disminución de carga negativa en los linfocitos después de la transformación blástica (228)

Nosotros hemos encontrado que una subpoblación de linfocitos B activan complemento, mientras que linfocitos T carecen de esta propiedad, adquiriéndola después de una estimulación mitogénica ó alogénica. Esto nos sugería que una deficiencia de carga negativa podría estar relacionada con el fenómeno de activación de complemento, por lo que nos planteamos separar las células mediante electroforesis celular y estudiar la capacidad de activar complemento en las diferentes fracciones obtenidas.

III.4.2.1. Movilidad electroforética y activación de complemento por linfocitos de amígdalas.

Mediante electroforesis celular analítica estudiamos la distribución eléctrica de los linfocitos de amígdalas y los resultados obtenidos aparecen en la figura 25. Las células se distribuyen según 6 diferentes movilidades electroforéticas con

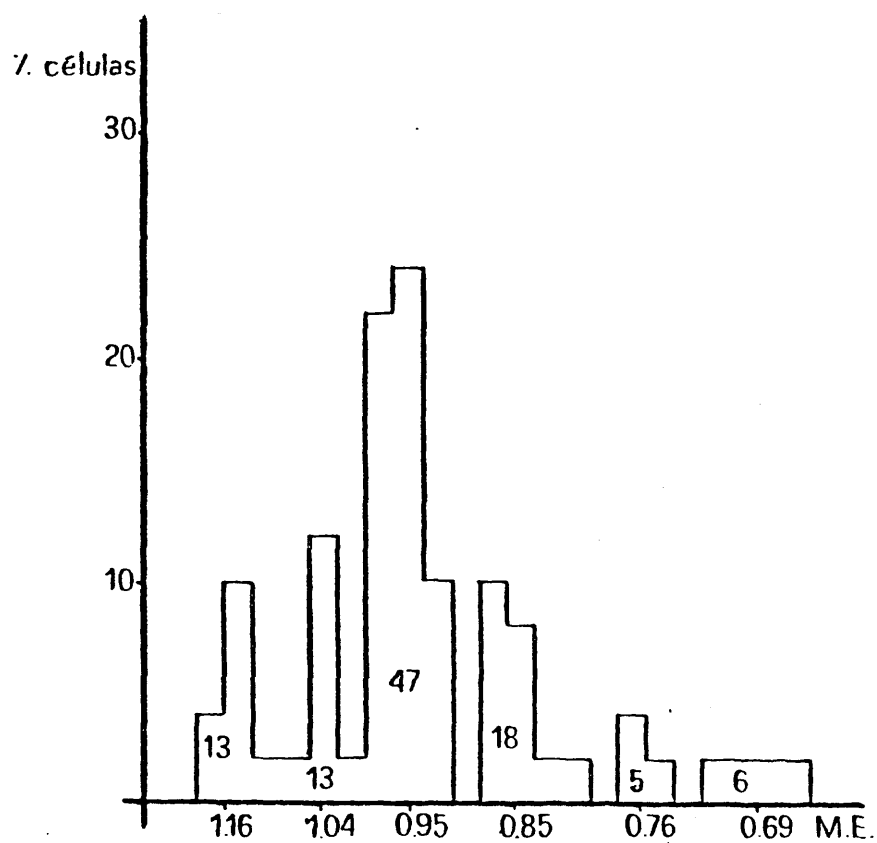


Figura 25. ELECTROFORESIS CELULAR DE LINFOCITOS DE AMIGDALAS.

Se obtiene una distribución de los linfocitos en función de la carga eléctrica de su membrana.

distintos porcentajes en cada una de ellas. Para caracterizar las células de las diferentes fracciones, obtuvimos células de cada movilidad electroforética por electroforesis celular preparativa, y estudiamos inmunoglobulinas de superficie y activación de complemento.

La existencia de células con inmunoglobulinas de superficie (linfocitos B) va aumentando a medida que la movilidad electroforética disminuye (Tabla 26), variando desde un 16% de linfocitos con inmunoglobulinas de superficie en la fracción con movilidad electroforética de 1.16 hasta un 86% de linfocitos B en la fracción más lenta (M.E. = 0.76). Estos datos están de acuerdo con los encontrados por otros autores acerca de la movilidad electroforética de células de órganos linfoides. En cuanto a la activación de complemento se distribuye a lo largo de las diferentes fracciones, encontrando aproximadamente la mitad de células con capacidad de activar el sistema de complemento de las células que tienen inmunoglobulinas en su membrana.

Cuándo se sometieron a electroforesis celular linfocitos no T de amígdalas, no se encontraron células en la fracción más rápida (M.E. 1.16) (Fig. 26). En esta fracción trabajando con linfocitos totales de amígdalas, encontrábamos un 16% de células con inmunoglobulinas de superficie y desaparece cuando la población originaria que se somete a la electroforesis celular son linfocitos no T, reafirmandonos que está formada por linfocitos derivados del timo. Como ya habíamos indicado anteriormente, los linfocitos T tienen una marcada movilidad hacia el ánodo.

Como en el caso anterior estudiamos activación de complemento

TABLA 26

MOVILIDAD ELECTROFORETICA Y ACTIVACIÓN DE COMPLEMENTO POR LINFOCITOS DE AMÍGDALA.

MOVILIDAD

ELECTROFORETICA
($\mu\text{m} \cdot \text{cm} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{v}^{-1}$)

I g (%)

CAC (%)

1.16*	16	10
1.04	22	10
0.95	42	27
0.85	64	43
0.76	85	47

* Fracciones linfocitarias con diferente movilidad electroforética obtenidas por electroforesis celular preparativa. En estas fracciones se estudiaron inmunoglobulinas de superficie y activación de complemento.

to en las diferentes fracciones obtenidas por electroforesis celular preparativa y encontramos, según se ve en la tabla 27, que las células activadoras de complemento se distribuyen a lo largo de todas las movilidades electroforéticas. Los resultados hallados, tanto en el caso de linfocitos totales como de linfocitos no T, nos indican que no existe una relación directa entre la carga eléctrica de la superficie celular y la capacidad de activar complemento.

III.4.2.2. Movilidad electroforética y activación de complemento por linfoblastos de sangre periférica.

Estudiamos la movilidad electroforética de linfocitos totales de sangre periférica mantenidos en cultivo durante 3 días en presencia y ausencia de PHA, y como puede verse en la tabla 28, mediante electroforesis celular analítica comprobamos que la activación mitogénica conlleva una disminución de la carga negativa. La distribución de linfocitos en reposo y de linfoblastos, según 3 movilidades electroforéticas, es diferente, así la mayoría de los linfocitos en reposo (74%) son células rápidas ($M.E. = 1.16 \mu m.cm. s^{-1}. v^{-1}$), es decir, con más carga negativa. Solamente el 21% de los linfoblastos se encuentra en esta población, hallándose el porcentaje mayor de los mismos (66%) en la fracción intermedia ($1.06 \mu m.cm. s^{-1}. v^{-1}$). Otros autores (228) también han descrito esta disminución de carga negativa como consecuencia de la transformación blástica, y estos datos parecían apuntar la posibilidad de que una

140

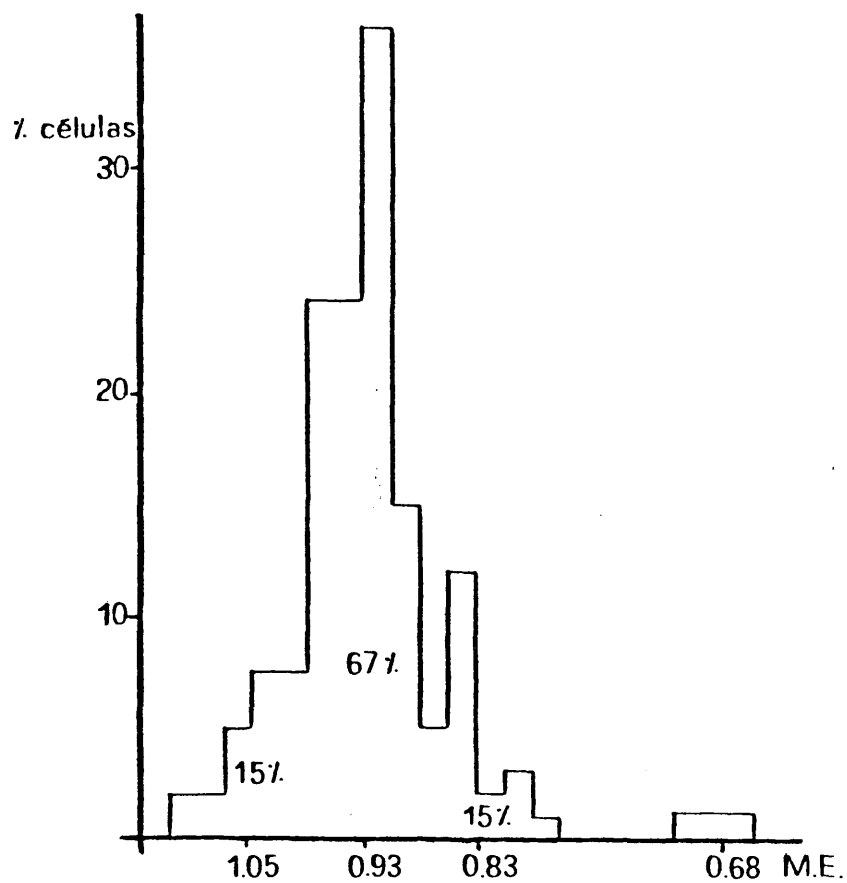


Figura 26. ELECTROFORESIS CELULAR DE LINFOCITOS B DE AMIGDALAS.

Se obtiene una distribución de los linfocitos en función de la carga eléctrica de su membrana.

141

TABLA 27

MOVILIDAD ELECTROFORETICA Y ACTIVACIÓN DE COMPLEMENTO POR LINFO-
CITOS B DE AMIGDALA.

MOVILIDAD

ELECTROFORÉTICA

CAC (%)

($\mu\text{m.cm.s.}^{-1}\text{v.}^{-1}$)

1.05^{*}

60

0.93

61

0.83

53

^{*}Fracciones linfocitarias con diferente movilidad electroforética
obtenidas por electroforesis celular preparativa. En estas
fracciones se estudió activación de complemento.

disminución de la carga negativa podría estar relacionada con la capacidad de activar complemento, no obstante era necesario comprobarlo haciendo una electroforesis celular preparativa y estudiando activación de complemento en las diferentes fracciones recogidas. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 29, y en contra de lo esperado en las 3 poblaciones de distinta movilidad electroforética existen células en capacidad para activar el sistema del complemento.

Tanto en el caso de linfocitos B de amígdalas como en linfocitos de sangre periférica encontramos que poblaciones con diferente movilidad electroforética son capaces de activar complemento, por lo que podemos concluir que no existe una relación directa entre carga eléctrica y activación de complemento.

143

TABLA 28

CAMBIOS EN LA CARGA ELÉCTRICA DE LA MEMBRANA, COMO CONSECUENCIA
DE LA ACTIVACIÓN MITOGENICA.

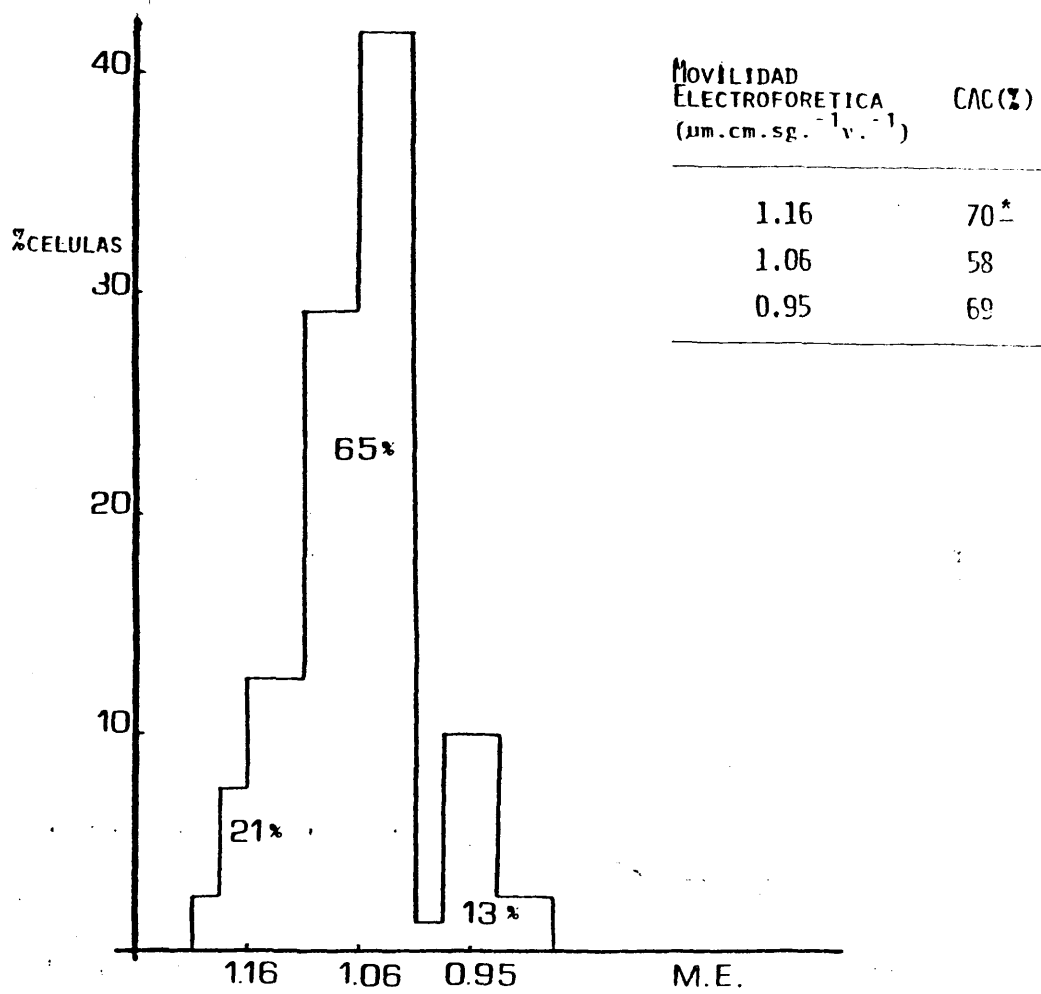
M.E. ($\mu\text{m.cm.s}^{-1}\text{v}^{-1}$)	PBL (%) [‡]	
	- PHA	+ PHA
1.16	74	21
1.06	15	66
0.95	8	12
0.85	3	-

[‡] Los linfocitos de sangre periférica se mantuvieron en cultivo con y sin mitógeno durante 3 días.

144

TABLA 29

MOVILIDAD ELECTROFORETICA Y ACTIVACION DE COMPLEMENTO POR
LINFOBLASTOS



* En las diferentes fracciones obtenidas se estudió activación de complemento por la técnica habitual.

DISCUSIÓN

Clásicamente, la principal y casi única función atribuida al sistema del complemento consiste en la opsonización y lisis de bacterias y otros microorganismos, por lo tanto se consideraba principalmente como un sistema de defensa. Con la descripción de receptores para diversos factores del complemento (16.-19) en algunas poblaciones linfocitarias, así como su papel en la respuesta inmune (161-174) y el crecimiento celular (166, 229, 230) se vió que además del mecanismo de defensa clásico podía desempeñar otras funciones biológicas. Posteriormente, con la descripción de activación de complemento por las membranas celulares (189- 203) se abrieron nuevas perspectivas.

En el presente trabajo, nosotros hemos estudiado la activación de complemento autólogo por células normales,desarrollando los siguientes puntos: caracterización y presencia en diferentes órganos linfoides de los linfocitos capaces de activar complemento y respuesta a mitógenos de las poblaciones activadora y no activadora de complemento; adquisición de la capacidad de activar complemento después de la estimulación mitogénica ó alogénica; dependencia de IL-2 en el crecimiento de los linfoblastos activadores, y por último posibles componentes de la membrana citoplasmática implicados en el fenómeno de activación de complemento.

Anteriormente a este trabajo, se había descrito la activau

ción de complemento por diferentes tipos de leucemias (196, 197) y por líneas celulares linfoblastoideas humanas, (190 - 193), incrementándose en estas la activación, cuando habían sido infectadas por EBV (193). Como la activación de complemento por células normales era muy pequeña comparada con la de estas líneas transformadas, se pensó que la activación de complemento pudiera ser un mecanismo de defensa del propio organismo orientado hacia la eliminación de estas células "peligrosas". Hay que señalar que estos autores habían estudiado únicamente células procedentes de sangre periférica, donde de acuerdo con nuestros experimentos la activación de complemento se produce en un pequeño porcentaje de células. Sin embargo, hemos visto que hasta un 30% de células de bazo, procedentes de donantes cadáver para trasplante renal, así como un 18% de linfocitos de amígdalas poseen dicha capacidad en un sistema autólogo. Por tanto, nosotros pensamos que la activación de complemento por membranas celulares debe tener un papel biológico diferente o adicional al expuesto por estos autores, que es el que hemos tratado de estudiar en este trabajo. El hecho de que en un sistema autólogo, en las condiciones estudiadas, nunca se produzca lisis celular, siendo necesaria la utilización de algunos sueros heterólogos para que esta tenga lugar, no explica que su única función sea la eliminación de células potencialmente malignas.

Apoyando la idea de que las estructuras de membrana capaces de activar complemento pudiesen ser un marcador biológico de maduración, están los experimentos de Kierszembau y

Budzo (200) que definen una subpoblación de timocitos de rata sensibles al complemento de cobaya, cuya eliminación hace desaparecer la respuesta a PHA y a ConA.

El grupo de Muller-Eberhard (205,206) ha descrito la presencia de neoantígenos del MAC en linfocitos, (que se incrementan con la incubación en suero autólogo), sin afectar a la viabilidad celular. Este complejo parece jugar un papel en las reacciones citotóxicas mediadas por anticuerpos (ADCC) (160), habiéndose visualizado en la zona de unión entre la célula diana y la célula efectora. Estos autores no encuentran explicación al hecho de que este complejo pueda ejercer una acción lítica sobre la célula diana sin afectar a la célula efectora.

Por tanto, todos estos datos tomados en conjunto apuntan hacia la idea, compartida por nosotros y apoyada con este trabajo, que la activación de complemento por linfocitos debe jugar funciones inmuno-reguladoras, sin descartar que pueda actuar como sistema de reconocimiento y eliminación de células transformadas.

La fluorescencia observada en linfocitos humanos después de la incubación con SHN es debida a un proceso activo y no a una mera captación de C3 nativo por las membranas celulares, ya que los componentes del complemento en estado nativo no se unen a estos, y la tinción fluorescente desaparece cuando el SHN ha sido tratado con EDTA ó calentado a 56°C. Esto queda totalmente demostrado con la existencia de fragmentos de C3, detectados por electroforesis bidimensional y por medida de capacidad hemolítica, en el SHN después de incubado con las células.

La separación de los linfocitos de sangre periférica después de eliminar los macrófagos, nos indicó que las células capaces de activar complemento se encontraban en la población no T (B + células "nulas") y representaba aproximadamente la mitad de las células que tenían inmunoglobulinas de superficie. Los linfocitos T así como los timocitos no tenían capacidad de activar complemento.

Estos datos se corroboraron con los encontrados en amígdalas, donde encontramos nuevamente que la población activadora se encuentra entre los linfocitos no T y representa aproximadamente la mitad de la población con inmunoglobulinas en su membrana.

En la población no T existen células B y células "nulas". Con la eliminación de células con receptores para el fragmento Fc de la IgG (principalmente células nulas), se obtuvo una población con un 98% de inmunoglobulinas de superficie y un 60% de células activadoras de complemento. De acuerdo con estos datos podemos concluir que los linfocitos humanos con capacidad activadora son una subpoblación dentro del compartimento de las células B.

Estos datos están de acuerdo con los de Sundsmo et al. (205) que encuentran que las células que expresan los determinantes antigénicos del MAC son principalmente de la estirpe B, y con las de Wilson et al. (207) que detectan diferentes componentes del complemento, principalmente el C4 y el factor H, únicamente sobre linfocitos B, y que líneas linfoblastoideas T como MOLT 4 (196) no activan complemento.

En todas las poblaciones linfocitarias estudiadas, la acti
vación de complemento es independiente de la presencia de anti-
cuerpos y parece producirse por la vía alternativa. Es indepen-
diente de la presencia de anticuerpos porque la utilización de
suero previamente absorbido y suero de un paciente agammaglobu-
linémico como fuentes de complemento no produce variaciones en
el porcentaje de células activadoras en todos los casos estu-
diados.

Tiene lugar por la vía alternativa porque la activación de
complemento desaparece cuando el factor B es inactivado por ca-
lentamiento del SHN a 52°C durante 20 min., y permanece cuando
existen en el suero iones Mg en ausencia de iones Ca (trata-
miento del SHN con EGTA 0.01M y Cl_2Mg 0.7 mM).

Dado que no todas las células B son capaces de activar com-
plemento, estudiamos la respuesta a PWM de las células B con y
sin capacidad de activar complemento, separadas mediante el
FACS. Como hemos desarrollado ampliamente en los resultados
los linfocitos B activadores tienen una proliferación muy in-
crementada en respuesta a PWM respecto a los no activadores,
así mismo, la población activadora segrega cantidades superio-
res de IgG y de IgM que las no activadoras.

En esta línea, existen diferentes estudios que llevan a
concluir que diferentes mitógenos, entre ellos el PWM, estimu-
lan distintas subpoblaciones o estadios de diferenciación de
los linfocitos B (37, 43, 44, 45, 51).

Es posible que las estructuras de la membrana que definen la capacidad de activar complemento sean adquiridas por los linfocitos B en un avanzado estado de su maduración hacia células plasmáticas. ¿Qué sentido puede tener en el contexto de la respuesta inmune la expresión de estas estructuras?

Es sabido que el C3 potencia la capacidad proliferativa de células B en respuesta a mitógenos como LPS (166), así mismo Dierich y Landen (209) han demostrado que el C3 activado forma puentes de unión entre células facilitando los contactos celulares necesarios para que tenga lugar la respuesta inmune, finalmente se sabe que el complemento activado es necesario para la localización de células sensibilizadas en los centros germinales, necesarios para la respuesta secundaria (152, 153). Por tanto, en el estadio en que los linfocitos B poseen estas estructuras, están en condiciones de fijar C3b a su membrana que podría actuar en las funciones anteriormente citadas.

Independientemente de las posibles implicaciones biológicas, estas estructuras de membrana con capacidad de activar complemento pueden ser un marcador fenotípico adquirido por los linfocitos B en su proceso de maduración, o bien pueden definir una subpoblación de linfocitos B con capacidad de respuesta a PWM.

En este sentido, creemos interesante el estudio del fenotipo de las poblaciones activadora y no activadora de complemento, ya que como hemos indicado en la Introducción existe una correlación entre la expresión de los isotipos de las inmunoglobulinas de membrana y el estadio de maduración de los linfocitos.

citos B, así como el estudio de la respuesta de estas dos poblaciones a otros mitógenos, como el *Staphylococcus aureus*, ya que está descrito que las poblaciones que responden a ambos son diferentes.

En el contexto de nuestros resultados adquiere especial importancia el hecho de la aparición de estructuras de membranas con capacidad de activar complemento en linfocitos T activados mito génica y alogénicamente, así como en linfoblastos mantenidos en cultivo prolongado con IL-2.

En los últimos años, han aparecido abundantes datos en la literatura sobre la expresión de nuevas estructuras antigénicas después de la activación de las células T. Algunas de estas estructuras se han identificado con antígenos de diferenciación que pueden definir subpoblaciones funcionales.

Entre ellos se encuentran los antígenos Ia, que no existen ó existen en baja densidad en linfocitos T (222) incrementándose notablemente como consecuencia de la transformación blástica (66, 232, 233). El significado funcional de esta población Ia⁺ es desconocido, aunque se ha especulado que estas células pueden ser células T supresoras, basándose en el hecho de que éstas células Ia⁺ poseen el receptor para el fragmento Fc de la IgG, pero no para el de la IgM (66).

Con el uso de anticuerpos monoclonales se han descrito los antígenos 4F2 (234, 235) y 5E9 (234), específicos de células linfoblastoideas humanas de la estirpe celular T, que pueden

ser marcadores útiles en estudios de diferenciación celular.

En cambio existen otros receptores, como son el receptor para el fragmento Fc de la IgG ó de la IgM, que se detectan en linfocitos T "en reposo" y activados, y que definen subpoblaciones funcionales (T_F y T_H respectivamente) (69-73). No obstante, su expresión varía con la estimulación alogénica, habiéndose observado a lo largo de un cultivo mixto la transformación de células T_H en T_F (235).

Finalmente, la activación de las células T produce la aparición de receptores para IL-2, a los cuales se une esta linfoquina manteniendo células T previamente activadas en cultivo prolongado. (226).

Otros de los componentes de membrana, que no existen ó bien no pueden detectarse por encontrarse en baja densidad en linfocitos "en reposo" y que aparecen como consecuencia de la transformación blástica son éstos descritos por nosotros, responsables de la activación de complemento. Hemos intentado relacionarlos con otras estructuras como son los receptores para IL-2, con la finalidad de conocer algunas de sus posibles funciones biológicas.

Hemos observado que la población de linfoblastos T activadores de complemento es dependiente de IL-2 en su crecimiento. Después de estar 2 días en cultivo con IL-2 el porcentaje de linfoblastos activadores de complemento aumenta hasta alcanzar

valores próximos al 60%, lo que nos puede indicar dos posibilidades:

- Las células activadoras de complemento tienen mayor capacidad de respuesta a IL-2 y se expanden cuando se cultivan en presencia de esta linfoquina.

- Los linfoblastos no activadores de complemento adquieren la capacidad de activar complemento, es decir sufren un cambio fenotípico después del estímulo producido por IL-2.

La mayor proliferación en respuesta a IL-2 de los linfoblastos T activadores frente a los no activadores y a los controles indica que la primera de estas alternativas sea más probable, esto es que la población activadora posee una mayor capacidad de respuesta a IL-2.

Esta mayor capacidad de respuesta puede deberse a la presencia de los complejos C3-anti-C3 en su membrana, o bien a una mayor concentración de receptores para este factor de crecimiento sobre la población activadora.

Nuestros datos sugieren que estos complejos pueden tener algún efecto sobre la proliferación, en respuesta a IL-2, ya que se produce un aumento en la síntesis de DNA cuando la población total de linfoblastos ha sufrido el proceso de activación de complemento antes de ponerse en cultivo con IL-2. No obstante, este efecto no puede explicar la gran diferencia encontrada entre la capacidad proliferativa de linfoblastos activadores y no activadores, especialmente teniendo en cuenta que solamente un 15% de células permanecen teñidas después de 6 días en cultivo.

Todos estos datos parecen indicar que la cantidad de receptores para IL-2 se encuentra incrementada en los blastos activadores de complemento, sugiriéndonos que la capacidad de activar complemento puede definir diferentes estadios funcionales de maduración o bien diferentes subpoblaciones.

Con estos estudios se abre una posible vía de caracterización de estadios de linfocitos T, que será necesario completar con futuras investigaciones estudiando el comportamiento de las poblaciones activadora y no activadora en citotoxicidad y cooperación celular.

Estos estudios cobran especial interés, teniendo en cuenta que se han encontrado CAC en algunos procesos patológicos, como la monucleosis infecciosa (191, 192) y en algunos tipos de leucemias (196, 197), y nuestros propios datos preliminares señalan un incremento en las células T activadoras de complemento en procesos autoinmunes, que posiblemente está relacionado con un mayor número de células T activadas circulantes.

Diferentes componentes de la membrana celular se han considerado como posibles responsables de la activación de complemento (125-130).

Fearon (127) ha descrito que existe una relación inversa entre el contenido en ácido siálico y la capacidad de activar

complemento de una partícula, ya que encuentra que la eliminación de este ácido de las membranas de los eritrocitos de carnero, convierte a estos en superficies activadoras, y que la capacidad de activar complemento de eritrocitos de ratón de diferentes géneros (135), donde la concentración de ácido siálico esta regulada por alelos de un locus autosómico, es función de dicha concentración. Proponen que el mecanismo de acción del ácido siálico es promover una asociación de alta afinidad entre el C3b unido y el factor H, sin influir en la afinidad del C3b por el factor B, como se ha expuesto ampliamente en la Introducción.

En los casos estudiados por nosotros la eliminación del ácido siálico de las membranas citoplasmáticas produce un aumento en el porcentaje de CAC, aunque este aumento no es del 100%, es decir, el tratamiento con neuraminidasa transforma células que potencialmente podrían activar complemento en activadoras. Ante esto, pensamos que una baja densidad de ácido siálico no es condición suficiente para que una membrana celular sea activadora de complemento, sino que posiblemente existan unas estructuras ~~intrínsecas~~ de membrana que son responsables de dicha activación y estan presentes en una población linfocitaria definida, de tal modo que el tratamiento con neuraminidasa las hace patentes en aquellas células en las que estaban enmascaradas por el ácido siálico. Estas estructuras son denominadas por el grupo Muller-Eberhard (128, 129) antagonistas del factor H, porque actúan impidiendo la unión de esta enzima con el C3b unido a la partícula.

Estos autores encuentran que se pueden transformar células no activadoras de complemento en activadoras uniendo un lipopolisacarido a las membranas citoplásmaticas, sin provocar ninguna modificación en el contenido de ácido siálico de las mismas (128).

Esta idea es también apoyada por los hallazgos de Kierszbaum y Budzko (200) quienes encuentran que la capacidad de activar complemento heterólogo por timocitos de rata aumenta al hacerlo la edad del timo, habiéndose descrito que el proceso de diferenciación y maduración de timocitos de ratón envuelve la unión de residuos de ácido siálico a residuos de galactosa y de N-acetil-galactosamina (236).

Existen datos contradictorios sobre la relación entre el contenido en ácido siálico y la carga eléctrica negativa de las membranas celulares. Así, mientras Wiig (237) establece que la carga negativa está principalmente determinada por la cantidad de ácido siálico, Despont et al. (238) encuentran que los linfocitos T y B de bazo de ratón tienen cantidades comparables de ácido siálico y sin embargo la movilidad es mucho mayor en los linfocitos T que en los B (227, 228), por lo que establecen que no existe una relación directa entre el contenido de ácido siálico y la carga eléctrica de la membrana.

El hecho de que nosotros hemos encontrado un cierto aumento en la activación de complemento después del tratamiento con neuraminidasa, y la aparición de estructuras activadoras después

de la transformación blástica nos sugirió que podía existir una relación entre la carga eléctrica de las membranas citoplasmáticas y la capacidad de activar complemento.

Sometiendo linfocitos humanos a electroforesis celular hemos encontrado que los linfocitos B tienen una carga negativa menor que los linfocitos T, y que estos disminuyen dicha carga después de sufrir la transformación blástica producida por estimulación mitogénica con PHA, datos que están de acuerdo con otros anteriormente descritos (229). Sin embargo, la activación de complemento estudiada en varias fracciones de linfocitos B y de linfoblastos T con diferente movilidad electroforética no ha dado diferencias significativas, lo que nos hace pensar que no existe una relación directa entre la capacidad de activar complemento y la carga eléctrica de las membranas citoplasmáticas.

Estos datos también indican que el ácido siálico no es el único factor determinante de la carga eléctrica negativa, tal y como sugieren Despont et al. (238).

A estas mismas conclusiones ha llegado Fearon (127) tratando eritrocitos de carnero con NaIO_4 , que convierte el ácido siálico en ácido heptulónico, produciendo una disminución de la carga negativa y sin afectar la capacidad de activar complemento.

Con este trabajo hemos establecido definitivamente que

algunas estructuras intrínsecas de la membrana citoplasmática de los linfocitos poseen capacidad de activar complemento, in dependientemente de la presencia de anticuerpos. Así mismo, hemos apuntado algunas de las funciones biológicas que este fenómeno puede desempeñar. La caracterización bioquímica de estas estructuras con la posible manipulación de las mismas ayudará a aclarar su papel en la respuesta inmune.

CONCLUSIONES

1. Linfocitos humanos normales procedentes de diferentes órganos linfoides presentan la capacidad de activar complemento. Dicha activación es independiente de la presencia de anticuerpos.
2. La activación de complemento por linfocitos tiene lugar por la vía alternativa.
3. Los linfocitos que activan complemento son una subpoblación del compartimento de células B.
4. Los linfocitos B activadores de complemento proliferan mejor y segregan mayor cantidad de IgG é IgM que los no activadores, en respuesta a PWM.
5. Los linfocitos T no activan complemento, pero adquieren las estructuras capaces de activarlo después de la estimulación alógena y mitógena con PHA.
6. El crecimiento de los linfoblastos T activadores de complemento es dependiente de IL-2.
7. Los linfoblastos T activadores muestran una respuesta a IL-2 incrementada respecto a los blastos no activadores.
8. Los complejos C3-anti-C3 sobre la membrana de los linfoblastos aumenta la capacidad proliferativa de estos en respuesta a IL-2.
9. La eliminación del ácido siálico provoca un aumento del porcentaje de células activadoras de complemento, pero una baja densidad en dicho ácido no es condición suficiente para que una superficie sea activadora de complemento.

10. Los linfocitos B tienen menor carga negativa que los linfocitos T.
11. La transformación blástica produce una disminución de la carga eléctrica negativa de los linfocitos.
12. No existe una relación directa entre la carga eléctrica de las membranas citoplasmáticas y la capacidad de activar complemento.

BIBLIOGRAFIA

1. J.SPARENT (1977) En: "The Lymphocyte : Structure and Function".
Ed.J.M. Marchaloin, Marcel Dekker. Inc. N.Y.
2. J.L. GOWANS y D.D. MCGREGOR (1965). Progr. Allergy 9, 1.
3. J.F.A.P. MILLER, A.BASTEN, J.SPARENT y C.CHEERS.(1971)
Cell. Immunol. 2, 469.
4. M.C. RAFF (1971). Transplant. Rev. 6 , 52 .
5. A. BASTEN, J. F. A.P. MILLER, J.SPARENT y J. PYE (1972)
J.Exp. Med. 135, 610 .
6. I.L. WEISSMAN (1967),J. Exp. Med. 126, 291.
7. G.MOLLER (Ed.) (1975) Transplant. Rev. 24 .
8. J.L. GOWANS y E.J. KNIGHT (1964) Proc. R. Soc. Lond.(Biol)
159, 257 .
9. I.L.WEISSMAN, G.A. GUTMAN y S.H. FRIEDBERG (1974)
Ser. Haematol. 8, 482 .
10. P. EHRLICH (1900). Proc. R. Soc. London Ser. BGG, 424 .
11. G. MOLLER (1973). Transplant. Rev. 14
12. J.J. MARCHALONIS (1975) Science 190, 20.
13. D. KATZ (1977) En: "Lymphocyte differentiation, Recognition
and Regulation". Eds. F.J. Dixon y H. Hunkel, Acad. Press,N.Y.
14. J.W. UHR (1965). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54, 1599.
15. A. T. SOBEL y V.A. BOKISCH (1975). Fed. Proc.34, 965.

16. H. OKADA y K. NISHIOKA (1973) J. Immunol. 111, 1444.
17. G.D. ROSS, M.J. POLLEY, E.M. RABELLINO y H.M. GREY(1978).
J. Exp. Med. 138, 798.
18. V.A. BOKISCH Y A. T. SOBEL (1974). J.Exp. Med. 140, 1336.
19. A. EDEN, G. W. MILLER y V. NUSSENZWEIG (1973). J. Clin.
Invest. 52, 3239.
20. V. NUSSENZWEIG (1974). Adv. Immunol. 19, 217.
21. E.L. ALEXANDER y P.A. HENKART (1978) Clin. Exp. Immunol. 33, 332.
22. W. J. PICHLER y S. BRODER (1978). J. Immunol. 121, 887.
23. H.B. DICKLER y H.G. KUNKEL (1972). J. Exp. Med. 136, 191.
24. G.M. EDELMAN (1978) Science 180, 830.
25. A. NISSONOFF, J.E. HOPPER y J.B. SPRING (1975). Eds. En:
" The Antibody Molecule ". Acad. Press, NY.
26. D.R. STANWORTH y M.W. TURNER (1978) En: " Handbook of Experi-
mental Immunology". Ed. D.M. Weir, Blackwell Scientific Pu-
blications.
27. L.A. HERZENBERG y L.A. HERZENBERG (1978). En: " Handbook
of Experimental Immunology". Ed. D.M. Weir, Blackwell Pub.
28. J.A. GALLY. (1973) En: " The Antigens " Vol.I, pp.162, Ed.
M. Sela, Acad. Press, N.Y.
29. J. OUDIN (1966) Proc. Roy. Soc. Ser. B 166, 207.
30. J.OUDIN y P.A. CAZENAVE (1971). Proc. Natl. Acad.Sci.USA
68, 2616.

31. A.J. CUNNINGHAM (1976). En: "Generation of Antibody Diversity ". Acad. Press. N.Y.
32. M. COHN. (1974). Progress. Immunology II, 261.
33. C. PAIGE, P.W. KINCADE, M.A.S. MOORE y G.LEE. (1979) J.Exp. Med. 149, 267.
34. C.J. PAIGE, P.W. KINCADE, L.A. SHINEFELD y V.L. SATO(1981) J. Exp. Med. 153, 154.
35. D. SLACK, G.P. DER-BALIAN, M. NAHM y J.M. DAVIE (1980) J.Exp. Med. 151, 853.
36. J.C. CAMBIER, E.S. VITETTA, J.W. UHR y J.B. KETTMAN (1977) J.Exp. Med. 145, 778.
37. E. GRONOWICZ y A. COUTINHO (1975) Transp.Rev.24,3.
38. B. HUBER, R.K. GERSHON y H. CANTOR (1977). J.Exp.Med.145,10.
39. B. HUBER (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76,3460.
40. J.P. McKEARN, J.W. PASLAY, J.SLACK, C. BAUM y J.M. DAVIE. (1982). Immunol. Rev. 64, 5.
41. A. SINGER, Y. ASANO, M. SHIGETA, K.S. HATCHCOCK, A. AHMED, C. G. FATHMAN y R.J. HODES (1982).Immunol. Rev. 64, 137.
42. K. TAKATSU y T. HAMAOKA (1982).Immunol.Rev.64, 25.
43. B. RYNELL- DAGOO (1978). Clin. Exp. Immunol. 34, 402.
44. P. GAUSSET, G. DELESPESE, J. DUCHATEAU y H. COLLET (1980). Immunology 41, 891.

45. K.A. AULT y M. TOWLE (1981). J. Exp. Med 153, 391.
46. O. SAIKI y P. RALPH. (1982) Eur. J. Immunol. 12, 506.
47. D. LEVITT y M.K. DAGG. (1981). Clin. Immunol. Immunopathol. 21, 50 .
48. C.J. THIELE, C.D. MORROW y R. H. STEVENS (1981) J.Immunol. 126, 1146.
49. F.D. FINKELMAN y D.E. LIPSKY (1978). J. Immunol. 120, 1465.
50. N. CHIORAZZI, S. H. FU y H. G. KUNKEL. (1980). Clin.Immunol. Immunopathol. 15, 301.
51. G. LUCIVERO, A.R. LAWTON y M. D. COOPER (1981) Clin. Exp. Immunol. 45, 189.
52. G. STATHOPOULOS y E.V. ELLIOT (1974). Lancet i, 600.
53. L.J. OLD., E.A. BOYSE y E. STOCKERT (1963). J. Natl.Canc. Inst. 31, 977.
54. B. STUCK, E.A. BOYSE, L. J. OLD y E.A. CARSWELL (1964). Nature (London) 203, 1033.
55. A.E. REIF y J.H.V. ALLEN (1964). J.Exp.Med. 120, 413.
56. J.P. LAMELIN, B. LISOWKA-BERNSTEIN, A. MATTER, J.E. RYSER y P. VASSALLI (1972). J. Immunol. 101, 99.
57. E.L. REINHERZ, P.C. KUNG, G. GOLDSTEIN y S.F. SCHLOSSMAN (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4061.
58. E.L. REINHERZ, P. C. KUNG, G. GOLDSTEIN y S.F. SCHLOSSMAN (1979) J. Immunol. 123, 2894.

59. E.L. REINHERZ y S. F. SCHLOSSMAN (1979) J. Immunol. 122, 1335.
60. E.L. REINHERZ, P.C. KUNG, G. GOLDSTEIN y S.F. SCHLOSSMAN
(1980). J. Immunol. 124, 1301.
61. E.L. REINHERZ, C. MORIMOTO, A.C. PENTA y S. F. SCHLOSSMAN
(1980) Eur. J. Immunol. 10, 570.
62. W. WEST, R.B. BOOZER y R. B. HEBERMAN (1978). J. Immunol.
120, 90.
63. S. HAMMARSTRÖM, V. HELLSTRÖM, P. PERLMANN y M.L. DILLNER
(1973) J. Exp. Med 138, 1270.
64. A. SAXON; V.D. MORLEDGE y B. BONAVIDA (1977). Clin. Exp.
Immunol. 28, 294.
65. R.L. EVANS, H. LAZARUS, A. C. PENTA y S. F. SCHLOSSMAN
(1978). J. Immunol. 129, 1423.
66. M.F. GREAVES, W. VERBI, M. FESTENSTEIN, C. PAPASTERIADIS
D. JARAQUEMADA y A. HAYWARD (1979) Eur. J. Immu-
nol. 9, 356.
67. M. FERRARINI L. MORETTA, R. ABRILE y M.L. DURANTE. (1975).
Eur. J. Immunol. 5, 70.
68. L. MORETTA, M. FERRARINI, M.L. DURANTE y M.C. MINGARI (1975).
Eur. J. Immunol. 5, 565.
69. L. MORETTA, M. FERRARINI, M.C. MINGARI, A. MORETTA y S.R.
WEBB (1976). J. Immunol. 117, 2171.

70. L. MORETTA, S. R. WEBB, C.E. GROSSI, P.M. LYDYARD y M.D. COOPER (1977a) J. Exp. Med. 146, 184.
71. S. GUPTA y R. A. GOOD.(1978). Cell. Immunol. 36, 263.
72. A. MORETTA, M.C. MINGARI, G.B. CANONICA, M. COLOMBATTI y L. MORETTA. (1980). En: "Thymic, Thymus hormones and T lymphocytes ". Ed. F. AIUTI y H. WIGZELL. p31. Acad.Press. N.Y.
73. A. MORETTA, M.C. MINGARI, M.COLOMBATTI y L. MORETTA. (1981 a) Scand. J. Immunol. 13, 423.
74. A. J. S. DAVIES, E. LEUCHAR, V. WALLIS, R. MARCHANT y E.V. ELLIOT (1967) Transplantation 5, 222.
75. J.F. A. P. MILLER y G.F. MITCHELL (1967) Nature (London) 216, 659.
76. G.F. MITCHELL y J. F. A. P. MILLER (1968) Proc. Natl.Acad. Sci. USA 59, 296.
77. F. H. BACH, M. L. BACH. y P.M. SONDEL (1976) Nature(London) 259, 273.
78. B. F. HAYNES y A. FAUCCI (1978) J. Immunol. 121, 559.
79. T.A. WALDMAN, M. DURM, S. BRODER, S. BLACKMAN, R.M. BLAESE y W. STROBER (1974) Lancet ii 609.
80. I. M. FAKULE y B. M. GREENWOOD (1976) Lancet ii 608.
81. H. CANTOR y E.A. BOYSE (1975).J.Exp. Med. 141, 1376.

82. P.C.L. BEVERLEY, J. WOODY, M. DUNKLEY, M. FELDMAN e I. MCKENZIE
(1976) Nature 262, 495.
83. M. NABHOLZ y V. MIGGIANO (1977) En: "B and T cells in Immune Recognition". Eds. P. Loo y G.E. Roelants, 12, p. 261.
84. F.H. BACH y K. HIRSCHHORN (1964) Science 143, 813.
85. B. BAIN, M.R. VAS y L. LOWENSTEIN (1964) Blood 23, 108.
86. F.H. BACH, M.L. BACH y P.M. SONDEL (1976) Nature 259, 273.
87. K. FISCHER-LINDAHL (1979) En: "Natural and Induced Cell-Mediated Cytotoxicity". Ed G. Reithmüller, P. Wernet y G. Gudkiewicz, Acad. Press, N.Y., p. 117.
88. G.D. SNELL, J. DAUSSET y S. NATHENSON (1976) En: "Histocompatibility". Eds. G.D. Snell, J. Dausset y S. Nathenson, Acad. Press, N.Y., p. 154.
89. F.H. BACH, M. SEGALL, K. STOUBER, P. SONDELL, B. ALTER y M. BACH (1973) Science 180, 403.
90. R.M. ZINKERNAGEL y P.C. DOHERTY (1973) J. Exp. Med. 138, 1266.
91. G. MOLLER (1978) Immunol. Rev. 42.
92. H. WALDMAN, H. POPE, L. BRENT y K. BIGHOUSE (1978) Nature 274, 166.
93. J. SPRENT (1978). J. Exp. Med. 148, 1838.
94. R. B. HERBERMAN, J. Y. DJEU, H.D. KAY, J.R. ORTALDO, C. RICCARDI, G.D. BONNARD, H.T. HOLDEN, R. FAGNANI, A. SANTONI y P. PUCETTI. (1979) Immunol. Rev. 44.

95. R.B. HERBERMAN (1973) Natl. Cancer Inst. Monogr. 37, 217.
96. R.B. HERBERMAN, M.E. NUNN y H.T. HOLDEN (1978) J. Immunol. 121, 304.
97. W.H. WEST, G.B. CANNON, H.D. KAY, G.D. BONNARD y R.B. HERBERMAN (1977). J. Immunol. 118, 355.
98. B. BENACERRAF e I. GREEN (1969). Ann. Rev. Med. 20, 141.
99. A.J. CROWLE (1975) Adv. Immunol. 20, 197.
100. L.T. YAM, C.Y. LI y W.H. CROSBY (1971) Am. J. Clin. Path. 55, 283.
101. E.R. KOSKI, D.G. POPLACK y R.M. BLAESE (1976) Immunology 31, 303.
102. D.H. KATZ, H.G. BLUESTEIN, R.J. ROUQUES y C.W. PIERCE (1970). J. Immunol. 106, 271.
103. W.H. LAY y V. NUSSENZWEIG (1968). J. Exp. Med. 128, 991.
104. D.S. NELSON (1976) En"Immunobiology of the macrophage". Acad. Press, N.Y.
105. H.J. MULLER-EBERHARD (1974). Ann. Rev. Biochem. 44, 697.
106. K.F. AUSTEN (1974). Transplant. Proc. 6, 1.
107. A.P. DALMASSO y H.J. MULLER-EBERHARD (1966). J. Immunol. 97, 680.
108. L. PILLEMER, L. BLUM, I.H. LEPOW, O.A. ROSS, E.W. TODD y A.C. WARDLAW (1954) Science 120, 279.

109. I.H. LEPOW (1961). En: "Immunochemical Approaches to Problems in Microbiology". Eds. M. Heideberger y O.J. Plescia. New Brunswick, N.J: Rutgers Univ. Press, p. 280.
110. A.L. SANDBERG, A.G. OSLER, H.S. SHIN y B. OLIVEIRA (1970). J. Immunol. 104, 329.
111. S. FLEXNER y H. NOGUCHI (1903). J. Exp. Med. 6, 277.
112. O. GOTZE y H.J. MULLER-EBERHARD (1972). N. Engl. J. Med. 286, 180.
113. I. GOODKOFISKY e I.H. LEPOW (1971). J. Immunol. 107, 1200.
114. D.T. FEARON y K.F. AUSTEN (1975). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3220.
115. K. WHALEY y S. RUDDY (1976). J. Exp. Med. 144, 1147.
116. J.M. WEILER, M.R. DAHA, K.F. AUSTEN y D.T. FEARON (1976). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3268.
117. M.R. DAHA, K.F. AUSTEN y D.T. FEARON (1978). J. Immunol. 120, 1389.
118. F. AUSTEN (1978). J. Immunol. 121, 795.
119. R.D. SCHREIBER y H.J. MULLER-EBERHARD (1974). J. Exp. Med. 140, 1324.
120. D.B. BUDZKO, V.A. BOKISCH y H.J. MULLER-EBERHARD (1971) Biochemistry 10, 1166.
121. U. NILSSON y J. HAPES (1973). J. Immunol. 111, 293.
122. N. TAMURA y R.A.J. NELSON (1967). J. Immunol. 99, 582.

123. P.J. LACHMANN y H.J. MULLER-EBERHARD (1968). J. Immunol. 100, 691.
124. S. RUDDY y K.F. AUSTEN (1971). J. Immunol. 107, 742.
125. P.J.A. CAPEL, O. GROENEBOER, G. GROSVELD y K.W. PONDMAN (1978). J. Immunol. 121, 2566.
126. D.C. MORRISON y L.F. KLINE (1977). J. Immunol. 118, 362.
127. D.T. FEARON (1978). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1971.
128. M.K. PANGBURN, D.C. MORRISON, SCHEREIBER y MULLER-EBERHARD (1980). J. Immunol. 124, 977.
129. M.K. PANGBURN y H.R. MULLER-EBERHARD (1978). Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 2416.
130. C.M. CUNNINGHAM, M. KINGZETTE, R.L. RICHARDS, C.A. ALVING, T.F. LINT y H. GEWURZ (1979). J. Immunol. 122, 1237.
131. D.T. FEARON y K.T. AUSTEN (1977). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 1683.
132. D.T. FEARON y K.T. AUSTEN (1977). J. Exp. Med. 146, 22.
133. M.K. PANGBURN y H.J. MULLER-EBERHARD (1978). J. Immunol. 120, 1791.
134. M.D. KAZATCHKINE, D.T. FEARON y K.J. AUSTEN (1979). J. Immunol. 122, 75.
135. NYDEGGER, D.T. FEARON y K.T. AUSTEN (1978). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 6078.
136. H.J. MULLER-EBERHARD, A.P. DALMASSO y H.A. CALCOTT (1966). J. Exp. Med. 123, 33.

137. S.K. LAW y R.P. LEVINE (1977). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 2701.
138. S.K. LAW, N.A. LICHTENBERG y R.P. LEVINE (1979). J. Immunol. 123, 1388.
139. B.F. TACK, J. JANATOVA, P.E. LORENZ, A.N. SCHECHTER y J.W. PRAHL (1980). J. Immunol. 124, 1542 (Abstr.).
140. M.K. PANGBURN (1980). Fed. Proc. 39, 1755 (Abstr.).
141. M.K. PANGBURN y H.J. MULLER-EBERHARD (1980). 152, 1102.
142. R.D. SCHEREIBER, M.K. PANGBURN, P.H. LESAVRE y H.J. MULLER-EBERHARD (1978). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 3948.
143. P. LESAVRE y H.J. MULLER-EBERHARD (1978). J. Exp. Med. 148, 1498.
144. B. MANTOVANI, M. RABINOVITCH y V. NUSSENZWEIG (1972). J. Exp. Med. 135, 780.
145. H. HUBER, M.J. POLLEY, W.D. LINSOTT, H.H. FUDENBERG y H.J. MULLER-EBERHARD (1968). Science 162, 1281.
146. I. GOLDSTEIN, S. HOFFSTEIN, J. GALLIN y G. WEISSMANN (1973). Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.) 70, 2916.
147. E.L. BECKER, H.J. SHOWELL, P.M. HENSON y L.S. HOV (1974). J. Immunol. 112, 2047.
148. H.U. SHORLEMMER y A.C. ALLISON (1976) Immunology 31, 781.
149. I.M. GOLDSTEIN y G. WEISSMANN (1974) J. Immunol. 113, 1583.
150. R.R. DOURMASHKIN y S. PATTERSON (1975). Inflammation 1, 155.

151. C. BIANCO, R. PATRICK y V. NUSSENZWEIG (1970). J. Exp. Med. 141, 1278.
152. P. DUKOR, F.M. DIETRICH, R.H. GISLER, G. SCHUMANN y D. BITTER-SUERMAN (1974). En: "Progress en Immunology II". Eds. L. Brent y J. Holborow, North-Holland Publishing Co., Amsterdam, p. 99
153. M. PAPAMICHAIL, C. GUTIERREZ, P. EMBLING, E. JOHNSON, E.J. HOLBOROW y M.B. PEPYS (1975). Scand. J. Immunol. 4, 343.
154. P. PERLMAN (1976). En: "Clinical Immunobiology". Vol. 3. Eds. F.H. Bach y R.A. Good, Acad. Press, N.Y., p. 107.
155. I.C. M. McLENNAN (1976). En: "Clinical Tumor Immunology". Eds. J. Wybran y M.J. Staquet, Pergamon Press, Oxford, p.47.
156. G. TRINCHIERI, P. BAUMANN, M. de MARCHI y Z. TOKES (1975). J. Immunol. 115, 249.
157. P. PERLMANN y G. HOLM (1969). Adv. Immunol. 11, 117.
158. P. PERLMANN, H. PERLMANN y H.J. MULLER-EBERHARD (1975). J. Exp. Med. 141, 287.
159. H. LUSTIG y C. BIANCO (1976). J. Immunol. 116, 253.
160. J.S. SUNDSMO y H.J. MULLER-EBERHARD (1979). J. Immunol. 122, 2371.
161. M.B. PEPYS (1974). J. Exp. Med. 140, 126.
162. M.B. PEPYS, M.H. WANSBROUGH-JONES y D.D. MIRJAH (1976). Clin. Exp. Med. 23, 378.

163. M.B. PEPYS, M.H. WANSBROUGH-JONES, D.D. MIRJAH y A.C. DASH (1976). J. Immunol. 116, 1746.
164. G.J.V. NOSSAL, A. ABBOT, J. MITCHELL y Z. LUMMERS (1968). J. Exp. Med. 127, 277.
165. V. NUSSEZWEIG, C. BIANCO y A. EDEN (1973). En: "3rd International Convocation on Immunology, Specific Receptors of Antibodies, Antigens and Cells". Ed. D. Pressman, Basel, p. 317.
166. G. MULLER y A. COUTINHO (1975) J. Exp. Med. 141, 647.
167. P. DUKOR y K.H. HARTMANN (1973). Cell. Immunol. 7, 349.
168. F.S. ROSEN (1975). En: "Immunogenetics and Immunodeficiency". Eds. B. Benacerraf. University Park Press, Baltimore. p. 229.
169. A. COUTINHO (1975). Transplant. Rev. 23, 49.
170. WHALEY K. (1980) J. Exp. Med. 151, 501.
171. D.W. MASON (1976) J. Exp. Med. 143, 1122.
172. G. JANOSSY, J.H. HUMPHREY, M.B. PEPYS y M.F. GREAVES (1973). Nature (London), New Biol. 246, 108.
173. T. DIAMANTSTEIN y E. BLISTEIN-WILLINGER (1975). Immunology 29, 1087.
174. R.J. ELIN, A.L. SANDBERG y D.L. ROSENSTREICH (1976). J. Immunol. 117, 1238.
175. F.H.J. ALLEN (1974). Vox. Sang. (Basel) 27, 382.
176. S.M. FU, H.G. KUNKEL, H.P. BROSMAN, F.H.J. ALLEN y M. FOTINO (1974). J. Exp. Med. 140, 1108.

177. C.H. RITTNER, G. HAUPTMANN, H. GROSSE-WILDE, E. GROSSHANS, H.M. TONGIO y S. MAYER. En: "Histocompatibility testing 1975". Ed. F. Kissmeyer-Nielsen. Copenhagen: Munksgaard p. 945.
178. G. J. O'NEILL, S. YOUNG YANG y B. DUPONT (1978). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 5165.
179. M.H. ROOS, E. MOLLENHAVER, P. DEMANT y C. RITTNER (1982). Nature 298, 854.
180. E. HINZOVÀ, P. DÉMANT y P. IVANYI (1972). Folia Biol. 20, 237.
181. P. DÉMANT, J. CAPKOVÁ, E. HINZOVÁ y B. VORÁCOVÁ (1973). Proc. Natl. Acad. Sci. 70, 863.
182. T.H. HANSEN, SHIN H.S. y D.C. SCHEFFLER (1975). J. Exp. Med. 141, 1216.
183. K.B.M. REID, D.M. LOWE y R.R. PORTER (1972). Biochem. J. 130, 749.
184. M. LOOS y R. THESEN (1978). J. Immunol. 121, 24.
185. N.C. HUGHES-JONES, B. GARDNER y J. ROWLANDS (1978). 4th European Immunology Meeting, Budapest, Abstracts, p. 99.
186. G. FUST, A. ERDEI, G. SARMAI, G.A. MEDGYESI y J. GERGELY (1976). Clin. Immunol. Immunopathol. 5, 377.
187. H. KITAMURA, H. TESHIMA y N.K. DAY (1978). Vox. Sang. 35, 197.
188. P.J. LACHMANN (1978). En: "Clinical Aspects of Immunology". Eds. P.G.H. Gell, R.R.A. Coombs y P.J. Lachmann, Blackwell, Scientific, London 3rd.ed. o. 323.

189. T.A.E. PLATTS-MILLS y K. ISHIZAKA (1974). J. Immunol. 113, 348.
190. H. OKADA y T. BABA (1974). Nature (London) 248, 521.
191. A.N. THEOFILOPOULOS y L.H. PERRIN (1977). Science 195, 878.
192. D.B. BUDZKO, P.J. LACHMANN e I. McCONNELL (1976). Cell. Immunol. 22, 98.
193. I. McCONNELL, G. KLEIN, T.F. LINT y P.J. LACHMANN (1978). Eur. J. Immunol. 8, 453.
194. J.G.P. SISSONS, M.B.A. OLDSTONE y R.D. SCHEREIBER (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 559.
195. I. McCONNELL, G. KLEIN, M. MACANOVIC, N.T. GORMAN y J. RANIWALLA (1981). Eur. J. Immunol. 11, 132.
196. T. SHIMBO, J. YATA y H. OKADA (1978). In. J. Cancer 22, 422.
197. I. McCONNELL, N.T. GORMAN, J. RANIWALLA y P. POWELL (1981). Eur. J. Immunol. 11, 126.
198. F. KIERSZENBAUM y D.B. BUDZIKO (1977). Cell. Immunol. 29, 137.
199. D.B. BUDZKO, F. KIERSZENBAUM y B.H. WAKSMAN (1977). J. Immunol. 119, 381.
200. F. KIERSZENBAUM y D.B. BUDZKO (1978). J. Immunol. 121, 166.
201. F. KIERSZENBAUM y D.B. BUDZKO (1979). Immunology 38, 827.
202. D. EIDINGER, I. GERY y E. BELLO (1977). Cell. Immunol. 29, 174.
203. D. EIDINGER, I. GERY y E. BELLO (1977). Cell. Immunol. 29, 187.
204. A.B. WILSON, P.J. LACHMANN y R.R.A. COOMBS (1979). Immunology 37, 25.

205. J.S. SUNDSMO, W.P. KOLB y H.J. MULLER-EBERHARD (1978). J. Immunol. 120, 850.
206. J.S. SUNDSMO, J.G. CURD, W.P. KOLB y H.J. MULLER-EBERHARD (1978). J. Immunol. 120, 855.
207. A.B. WILSON, S. PRICHARD-THOMAS, B.W. GURNER, P.J. LACHMANN y R.R.A. COOMBS (1982). Clin. Immunol. Immunophatol. 22, 118.
208. J.S. SUNDSMO, J.K. SELBERG, A.C. CHIN y O. GOTZE (1979). En: "Proceedings 13th. International Leucocyte Culture Conference". Ed. J.G. Kaplan. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
209. M.P. DIERICH y B. LANDEN (1977). J. Exp. Med. 146, 1484.
210. A. BOYUM (1968) Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21.(suppl.97), 72.
211. M. JONDAL, G. HOLM y H.J. WIGZELL (1972). J. Exp. Med. 137, 1532.
212. M. PAPAMICHAIL, C. GUTIERREZ y E.J. HOLBOROW (1976). J. Immunol. 11, 225.
213. J.H. DEAN, J.S. SILVA, J.L. MCCOY, C.M. LEONARD, C.B. CANON y R.B. HERBERMAN (1975). J. Immunol. 115, 1449.
214. I.T. KURNICK, M. STEGAGNO, O. SJOBERG, A. ORN y H. WIGGZELL (1978). En: "Proceedings of the 12th International Leukocyte Culture Conference" (Israel) p. 42.
215. J.M. ALVAREZ, A. SILVA y M.O. de LANDAZURI (1979). J. Immunol. 123, 977.

216. S. GILLIS, M.M. FERM, W. OU y K.A. SMITH (1978). J. Immunol. 120, 2027.
217. K.A. BROWN, P.H.F. EMBLING, J.D. PERRY y E.J. HOLBOROW. (1979). Clin. Exp. Immunol. 36, 272.
218. C. GUTIÉRREZ, J. VEGA y M. KREISLER. (1979). Eur. J. Immunol. 9, 72.
219. L.P. EINSTEIN, E.E. SCHNEABURGER y H.R. COLTEN (1976). J. Exp. Med. 143, 114.
220. C. DECEULAER, S. PAPOZOGLU y F. WHALEY (1980). Immunology 41, 37.
221. M.J. MARTIN, J. VEGA y C. GUTIERREZ (1980). Immunology 41, 535.
222. J.H.D. PLATE y I.F.C. MCKENZIE (1973), Nature (New Biol.) 245, 247.
223. L.A. AARDEN, F.T. BRUNNER y J.C. CEROTTINI (1979). J. Immunol. 123, 2928.
224. D.A. MORGAN, F.W. RUSCETTI y R.C. GALLO (1976). Science 193, 1007.
225. S. GILLIS y K. SMITH (1977). Nature 268, 154.
226. J. E. RYSER, J.C. CEROTTINI y K.T. BRUNNER (1978). J. Immunol. 120, 370.
227. M. WIOLAND, D. SABOLOVIC y C. BURG (1972). Nature (New Biol.) 237, 274.
228. J.N. WIIG y S. THUNOLD (1973). Clin. Exp. Immunol. 15, 497.

229. V. GALILI, P. HAYRY y E. KLEIN (1979). Cell. Immunol. 48, 91.
230. K.U. HARTMANN y V.A. BOKISCH (1975). J. Exp. Med. 142, 600.
231. K.U. HARTMANN (1975). Transplant. Rev. 23, 98.
232. W.C. DEWOLF, S.F. SCHLOSSMAN y E.J. YUNIS (1979). J. Immunol. 122, 1780.
233. H.KO, S.M. FU, R.J. WINCHESTER, D.T. Y. YU y H.G. KUNKEL (1979). J. Exp. Med. 150, 246.
234. B.F. HAYNES y A.S. FAUCI (1981). En: "Human B cell Function : Activation and Immunoregulation". Eds. A.S. Fauci y R.E. Ballieux, Raven Press, New York.
235. L. MORETTA, A. MORETTA, G.W. CANONICA, A. BACIGALUPO, M.C. MINGARI y J.C. CEROTTINI (1981). Immunol. Rev. 56, 141.
236. N. SHARON é Y. REISREN (1979). En: "Molecular Mechanisms of Biologicae Recognition". Ed. M. Balaban. Elsevier-North Holland Biomedical Press Amsterdan. p. 95.
237. J.N. WIGG (1974). Scand J. Immunol. 9, 357.
238. J.P. DESPONT, C.A. ABEL y H.M. GREY (1975). Cell. Immunol. 17, 487.

